

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARIZE MAZUR

APLICAÇÃO DE METODOLOGIA POR NIR PARA DETERMINAÇÃO DE
METILXANTINAS PRESENTES NA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)

CURITIBA

2012

LARIZE MAZUR

APLICAÇÃO DE METODOLOGIA POR NIR PARA DETERMINAÇÃO DE
METILXANTINAS PRESENTES NA ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis*)

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do título de Mestre
no Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, PPGEAL, do
Setor de Tecnologia da Universidade
Federal do Paraná.

CURITIBA

2012

M476a

Mazur, Larize

Aplicação de metodologia por NIR para determinação de metilxantinas presentes na erva-mate (*Ilex paraguariensis*). [manuscrito] / Larize Manzur. – Curitiba, 2012.

80f. : il. [algumas color.] ; 30 cm.

Impresso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos, 2012.

Orientadora: Rosemary Hoffmann Ribani.

1. Erva-mate. 2. Chimarrão. I. Universidade Federal do Paraná. II. Ribani, Rosemary Hoffmann . III. Título.

CDD: 663.96

LARIZE MAZUR

**APLICAÇÃO DE METODOLOGIA POR NIR PARA
DETERMINAÇÃO DE METILXANTINAS PRESENTES NA ERVA-
MATE (*Ilex paraguariensis*)**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Orientadora: Prof^a. Dr^a. ROSEMARY HOFFMANN RIBANI
Setor de Tecnologia, UFPR


Dr^a. LÍLIAN CRISTINA CÔCCO
Setor de Tecnologia, UFPR


Prof^a. Dr^a. FERNANDA DE CASTILHOS
Setor de Tecnologia, UFPR

Curitiba, 02 de março de 2012.

“Considerar a nossa maior angústia como um incidente sem importância, não só na vida do universo, mas da nossa mesma alma, é o princípio da sabedoria.”

Fernando Pessoa

Dedico este trabalho a minha mãe,
ao Bruno, à minha família e a
todos meus amigos que torceram
por mim ao longo do curso

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, especialmente pela força e serenidade nos momentos de dificuldade, proporcionando a aprendizagem.

A minha mãe Roseli, pelo amor incondicional de sempre, pelo colo sempre quando precisei e principalmente pelo apoio e confiança.

Ao meu namorado Bruno que sempre me amparou nos momentos difíceis, pelo seu amor e pela compreensão dos momentos de mau humor e desespero.

A minha orientadora Rosemary pela orientação exemplar e pelo carinho de mãe que sempre demonstrou, além de toda confiança em mim.

A todos os meus familiares que sempre acreditaram em mim e me apoiaram.

As minhas amigas de todas as horas, Leomara e Luana. Não sei se conseguiria chegar aqui sem a ajuda de vocês. Agradeço também por toda a alegria proporcionada.

Aos professores Noemi e Patrício por toda ajuda e por todo conhecimento transmitido.

Aos colegas do PPGEAL pelo apoio, ao Bogdan por toda ajuda com o HPLC e pelas parcerias de trabalho, a Milene e Gabi, pela equipe de sucesso formada e pelo apoio durante as descobertas sobre calibração.

Ao Marcelo, técnico do laboratório que nunca se cansou de me ajudar nos experimentos.

A Silvana, responsável pelo Laboratório de Anatomia e Identificação da Madeira, pelo auxílio durante minhas análises no NIR.

A Embrapa- Florestas pelas amostras cedidas e pela receptividade.

Aos membros da banca, que aceitaram o convite de fazer parte da defesa desta dissertação.

A todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

RESUMO

A erva-mate é uma espécie nativa de florestas subtropicais e cresce naturalmente no Brasil, Paraguai e Argentina. É amplamente conhecida e utilizada pelos habitantes desses países, onde apresenta importância socioeconômica considerável, sendo consumida como "chimarrão" ou "tererê". O consumo da erva-mate tem aumentado devido aos benefícios à saúde, atribuída à presença de compostos fitoquímicos, principalmente metilxantinas, polifenóis e saponinas. As metilxantinas apresentam propriedades farmacológicas como a estimulação do sistema nervoso central, vasoconstrição periférica, relaxamento do músculo liso e estimulação do miocárdio. A cafeína é amplamente utilizada na indústria farmacêutica e cosmética ou como um ingrediente em alimentos funcionais. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a metodologia comumente utilizada na determinação de metilxantinas em erva-mate, sendo uma técnica onerosa e destrutiva. O uso de espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) é um método não destrutivo simples e rápido de análise, o que facilita a execução das operações de controle de qualidade. Esta técnica permite a análise *online* para a tomada de decisões durante o processamento e pode ser um instrumento eficaz para a quantificação de metilxantinas. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar o uso de espectroscopia na região do infravermelho próximo, combinado com as técnicas de calibração multivariada para a predição do teor de cafeína, teobromina em erva-mate. Um total de 25 amostras passaram por um processo de extração ácida das metilxantinas seguida por decocção, sendo então analisadas por CLAE para a quantificação de cafeína e teobromina presentes nas amostras. Os espectros na região NIR foram coletados das amostras sólidas e submetidos a um PCA, para determinar os conjuntos de calibração e validação. Vários modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos através de PLS, sendo avaliados através dos valores de RMSECV e R^2 . Os modelos de calibração para cafeína e teobromina não apresentaram boa correlação com valores de erro absoluto durante a validação cruzada de 31% e 48,71%, respectivamente. Devido a semelhança estrutural da cafeína e teobromina foram desenvolvidos modelos para soma destas expressas como metilxantinas totais. O melhor modelo desenvolvido utilizou como pré-processamentos o alisamento, segunda derivada e MSC, a partir de 4 VL. Apresentando valores de R^2 e RMSECV de 0,924 e 0,2, respectivamente, com boa capacidade preditiva durante a validação externa com erro percentual de 7,5%, a análise por NIR pode ser aplicada para predição de teores de metilxantinas totais em erva-mate.

Palavras Chave: cafeína, teobromina, CLAE, espectroscopia do infravermelho próximo, calibração multivariada.

ABSTRACT

The yerba mate is an arboreal species that naturally grows in the subtropical forest regions of Brazil, Paraguay and Argentina. It is widely known and used by the inhabitants of these countries, where it has considerable socioeconomic importance and consumed in the form of “chimarrão” or “tererê”. The consumption of yerba mate has increased due to its health benefits, attributed to the presence of phytochemical compounds, mainly methylxanthines, polyphenols and saponins. The Methylxanthines have several pharmacological properties which comprise stimulation of the central nervous system, peripheral vasoconstriction, relaxation of the smooth muscle and myocardial stimulation. Caffeine is widely used in the pharmaceutical and cosmetic industry or as an ingredient in functional food. High performance liquid chromatography (HPLC) is the methodology commonly used in the determination of methylxanthines in mate, being a costly and destructive technique. The use of near infrared spectroscopy (NIR) is a nondestructive, simple and fast method of analysis, a fact that facilitates the implementation of quality control operations. This technique enables *online* analysis for decision during the processing which can be an effective instrument for quantification of methylxanthines. In this work the object was to evaluate the use of spectroscopy in the near infrared region, combined with multivariate calibration technique for prediction of caffeine, theobromine and total methylxanthines. For this 25 samples of yerba mate were extracted with acid decoction, and subsequently analyzed by HPLC for quantification of caffeine and theobromine. NIR spectra were acquired for solid samples and submitted to a PCA, to determine the calibration and validation sets. PLS models were developed after the spectral data pre-processed, being evaluated by the values of RMSECV and R^2 . The calibration models for caffeine and theobromine didn't correlate well as the values of absolute error for cross validation were 31% and 48,71%, respectively. Due to the similarity in structure and absorbance characteristics the sum of caffeine and theobromine expressed as total methylxanthines were evaluated for data models. The best model developed has used spectral pre-processed smoothing, second derivative and MSC from 4LV. Showing values of R^2 and RMSECV of 0,924 and 0,2, respectively, good predictive ability for external validation with an error of 7,5%, the NIR analysis can be applied for the prediction of the total methylxanthines yerba mate contents.

Keywords: Caffeine, theobromine, HPLC, near infrared spectroscopy, multivariate calibration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ÁREA DE OCORRÊNCIA DA ERVA-MATE NA AMÉRICA DO SUL	20
FIGURA 2 – PRODUÇÃO DE ERVA-MATE NO PARANÁ	21
FIGURA 3 - PRINCIPAIS METIXANTINAS PRESENTES NA ERVA-MATE	24
FIGURA 4 - INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO NIR COM PARTÍCULAS SÓLIDAS DA AMOSTRA	31
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA REFLEXÃO DIFUSA DE UMA ONDA ELETROMAGNÉTICA EM UMA AMOSTRA PARTICULADA	32
FIGURA 6 - COMPONENTES BÁSICOS DE UM EQUIPAMENTO QUE OPERA NA REGIÃO DO NIR	33
FIGURA 7 – ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	36
FIGURA 8 – CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE ERVA-MATE	49
FIGURA 9 – SEPARAÇÃO DO PADRÃO DE TEOBROMINA POR CLAE COM ESPECTROS	50
FIGURA 10 - SEPARAÇÃO DO PADRÃO DE CAFEÍNA POR CLAE COM ESPECTROS	50
FIGURA 11 – ESPECTROS DAS DUPLICATAS DAS 25 AMOSTRAS DE ERVA – MATE, COLETADOS EM UM ESPECTRÔMETRO BRUKER – TENSOR 37, EQUIPADO COM UM ACESSÓRIO DE REFLECTÂNCIA DIFUSA.	52

FIGURA 12 – PCA DAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE EM UM 53
INTERVALO DE ONDA DE 4000 A 9000 CM⁻¹

FIGURA 13 – RMSECV VERSUS NÚMERO DE VL OBTIDO PELO 56
MÉTODO DE PLS PARA O MODELO DE PREVISÃO DO TEOR DE
CAFEÍNA EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE

FIGURA 14 – GRÁFICO DE LEVERAGE *VERSUS* RESÍDUOS DE 56
STUDENT PARA MODELO 4

FIGURA 15 - VALOR MEDIDO *VERSUS* VALOR PREVISTO PELO 57
MODELO 4 PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO

FIGURA 16 – RMSECV VERSUS NÚMERO DE VL OBTIDO PELO 58
MÉTODO DE PLS PARA O MODELO DE PREVISÃO DO TEOR DE
TEOBROMINA EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE

FIGURA 17 – GRÁFICO DE LEVERAGE *VERSUS* RESÍDUOS DE 60
STUDENT PARA MODELO 14

FIGURA 18 – VALOR MEDIDO *VERSUS* VALOR PREVISTO PELO 60
MODELO 14 PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO

FIGURA 19 – RMSECV VERSUS NÚMERO DE VL OBTIDO PELO 62
MÉTODO DE PLS PARA O MODELO DE PREVISÃO DO TEOR DE
METILXANTINAS TOTAIS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE

FIGURA 20 – GRÁFICO DE LEVERAGE *VERSUS* RESÍDUOS DE 63
STUDENT PARA MODELO 28

FIGURA 21 - VALOR MEDIDO *VERSUS* VALOR PREVISTO PELO 64
MODELO 28 PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICAS DAS PRINCIPAIS METILXANTINAS	25
TABELA 2 - REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO	27
TABELA 3 - ATRIBUIÇÃO DAS REGIÕES ESPECTRAIS ÀS POSSÍVEIS TRANSIÇÕES VIBRACIONAIS	30
TABELA 4 – COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE METILXANTINAS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE PESQUISADAS POR DIVERSOS AUTORES	47
TABELA 5 – CONCENTRAÇÕES DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E METILXANTINAS TOTAIS NAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE QUANTIFICADOS POR CLAE APÓS PRÉVIA EXTRAÇÃO.	48
TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES CAFEÍNA E TEOBROMINA	51
TABELA 7 – LD E LQ OBTIDOS PELO MÉTODO DAS CURVAS ANALÍTICAS	51
TABELA 8 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CAFEÍNA	55
TABELA 9 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PRA TEOBROMINA	58
TABELA 10 – VARIAÇÃO DESCRITA PELO MODELO DE PLS PARA PREVISÃO DO TEOR DE TEOBROMINA EM ERVA-MATE	59
TABELA 11 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA METILXANTINAS TOTAIS	61
TABELA 12 – VALIDAÇÃO EXTERNA PARA OS MODELOS	28 63

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

CF – cafeína

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CP – componentes principais

g - gramas

I_0 – radiação refletida

I_R – radiação de referência

kg- quilograma

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

mg – miligrama

min - minuto

mL - mililitro

MSC - Correção Multiplicativa do Sinal

NIR – infravermelho próximo

nm - nanômetro

PCA – análise dos componentes principais

PLS - regressão por mínimos quadrados parciais

R – reflectância

R^2 - Coeficiente de Correlação de Calibração

RMSECV – Raiz do Quadrado do Erro Médio de Validação Cruzada

RMSEP – Raiz do Quadrado do Erro Médio de Previsão

SNV - Transformação Padrão Normal de Variação

TB - teobromina

VL – Variável Latente

X – Variáveis Independentes (Matriz dos números de ondas)

Y – Variáveis Dependentes (Matriz dos dados obtidos em laboratório)

μg - micrograma

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	OBJETIVOS.....	19
1.1.1	Objetivo Geral.....	19
1.1.2	Objetivos Específicos	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	ERVA- MATE.....	20
2.1.1	Processamento Agroindustrial.....	21
2.1.2	COMPOSTOS FITOQUÍMICOS PRESENTES NA ERVA-MATE	22
2.2	METILXANTINAS	23
2.3	ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)	27
2.4	ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS.....	34
2.4.1	Pré- Processamentos Espectrais.....	36
2.4.2	Análise de Componentes Principais (PCA)	38
2.4.3	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	39
2.4.4	Aplicação da Espectroscopia NIR.....	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	AMOSTRA DE ERVA-MATE	43
3.2	ANÁLISE DAS METILXANTINAS.....	43
3.2.1	Reagentes	43
3.2.2	Extração das Metilxantinas	43
3.2.3	Preparo dos Padrões	44
3.2.4	Análise Cromatográfica das Metilxantinas	44
3.3	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO.....	45
3.4	DESENVOLVIMENTOS DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA	45

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS METILXANTINAS.....	47
4.2	ESPECTROSCOPIA NIR	51
4.3	DESENVOLVIMENTOS DOS MODELOS MULTIVARIADOS.....	52
4.3.1	Análise dos componentes principais.....	52
4.3.2	Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)	54
	CONCLUSÕES	66
	REFERÊNCIAS.....	67
	ANEXO 1.....	80
	ANEXO 2.....	81

1. INTRODUÇÃO

A erva-mate é uma árvore nativa brasileira, sendo de importância socioeconômica para os países da América do Sul, ou seja, Brasil, Paraguai e Argentina, sendo consumida na forma de chimarrão ou tererê.

O consumo per capita de erva-mate no Brasil é de 1,2 kg por ano, sendo principalmente consumida nos estados da região sul. Este consumo está associado a benefícios a saúde humana, onde estudos *in vitro* mostram que o extrato de erva-mate contribui na prevenção de câncer, prevenção do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e danos ao DNA.

Na composição química da erva-mate encontramos os compostos fitoquímicos, principalmente os compostos fenólicos, saponinas e metilxantinas, estando associados com o sabor, odor, cor e estabilidade oxidativa dos alimentos. O teor desses compostos tem impulsionado um maior consumo de erva-mate.

As metilxantinas são estimulantes do sistema nervoso central, participam da vasoconstrição periférica e do relaxamento do músculo. A cafeína é amplamente utilizada nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos ou como ingrediente funcional em alimentos. Entre as metilxantinas, destacam-se a presença de cafeína, teobromina e teofilina, sendo que as duas primeiras encontram-se em maior quantidade.

A metodologia de extração analítica influencia no teor de metilxantinas extraídos e quantificados em amostras de erva-mate, outros fatores também podem influenciar como idade da planta, luminosidade, período de colheita, época da poda. Essas variáveis vêm sendo estudadas com a finalidade de padronizar os teores de metilxantinas.

Trabalhos publicados demonstram a conveniência da substituição de métodos convencionais de análise por métodos multivariados, principalmente em análise de matrizes complexas. A utilização de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) vem sendo muito aplicado no controle de qualidade em alimentos. A utilização do NIR pode ser uma alternativa eficaz para quantificação de metilxantinas em erva-mate, por ser um método não destrutivo e normalmente mais rápido de

análise, possibilitando análise destes compostos *online* para tomadas de decisões durante o processamento.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Estabelecer um modelo de calibração para quantificação das metilxantinas, cafeína (CF) e teobromina (TB) presentes na erva-mate pelo uso do NIR.

1.1.2 Objetivos Específicos

- a. Determinar o teor de metilxantinas, CF e TB presentes na erva-mate para chimarrão, através da digestão da amostra e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- b. Adquirir os espectros das amostras de erva-mate no NIR, por reflectância difusa.
- c. Realizar a análise dos componentes principais (PCA) para verificar se existem diferenças entre as amostras.
- d. Desenvolver um modelo de calibração multivariada de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), correlacionando os dados espectrais de infravermelho próximo e os teores das metilxantinas por CLAE.
- e. Verificar a capacidade de previsão dos modelos de calibração multivariada (PLS) desenvolvidos e validar os mesmos a partir das metodologias de validação cruzada e validação externa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ERVA- MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis*) é uma árvore perene nativa da América do Sul, pertencente à família *Aquifoliaceae*. Esta é uma espécie que apresenta grande importância socioeconômica nos países que constituem o MERCOSUL (SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005; REGINATTO *et al.*, 1999). Na Figura 1 está representada a ocorrência da erva-mate na América do Sul.

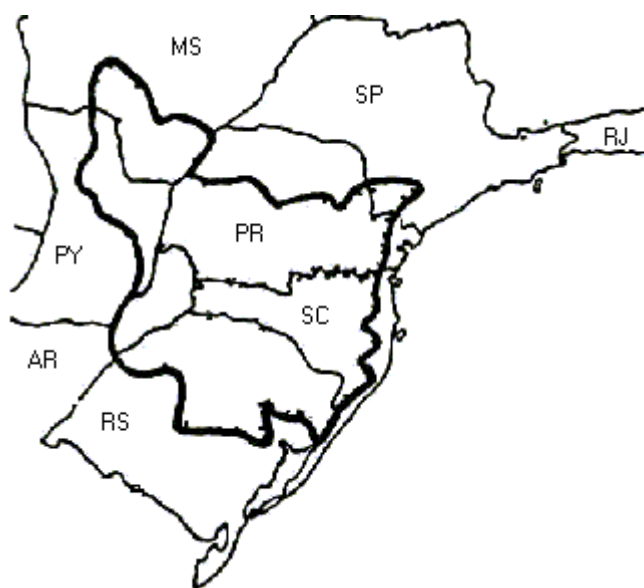


FIGURA 1 – AREA DE OCORRÊNCIA DA ERVA-MATE NA AMÉRICA DO SUL
FONTE: ADAPTADO DE ROTTA;OLIVEIRA (2005).

A erva-mate pode ser consumida na forma de chimarrão ou tererê, sendo que o primeiro é obtido com adição de água quente e o segundo de água fria, sendo mais consumida na forma de chimarrão, a qual se caracteriza por ser uma bebida de baixo valor calórico (VALDULGA, 1995; SIMÕES *et al.*, 2001).

O consumo de chimarrão faz parte do habito alimentar e cultural dos países sul-americanos. Os primeiros relatos de consumo desta bebida no Brasil datam de meados no século XVI na população indígena (ANUÁRIO BRASILEIRO DE ERVA-

MATE, 1999; SEAB, 1997). Estudos mostram que aproximadamente 30% da população total da América do sul consomem mais de um litro de chimarrão por dia (FILIP *et al.*, 2000; GNOATTO; SCHENKEL; BASSANI, 2005).

No ano de 2009 a produção agrícola de erva-mate foi 290 mil toneladas de folhas, de acordo com os dados da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná (SEAB), conforme apresentado na Figura 2.

Além do consumo de erva-mate na forma de chimarrão, esta vem sendo muito empregada na indústria alimentícia, de cosméticos, bebidas, farmacêuticas devido à diversidade de compostos fitoquímicos presente na erva-mate (JACQUES *et al.*, 2007), demonstrando a importância do desenvolvimento de metodologias rápidas de análise para quantificação desses compostos químicos.

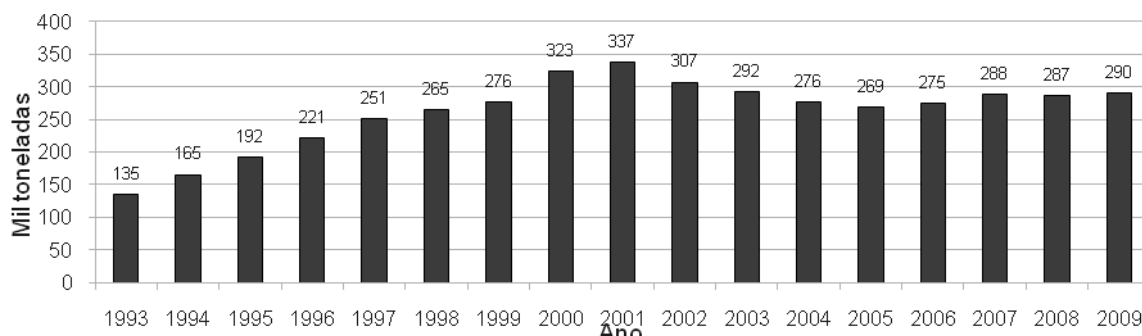


FIGURA 2 – PRODUÇÃO DE ERVA-MATE NO PARANÁ

FONTE: ALMEIDA-RUCKER *et al.* (2011)

2.1.1 Processamento Agroindustrial

O processamento de erva-mate consiste em algumas etapas básicas: colheita, sapeco (branqueamento), secagem, cancheamento, moagem e acondicionamento.

O sapeco consiste no contato rápido das folhas de erva-mate com chamas de fogo em fornos rotativos com a finalidade de reduzir a umidade das folhas, bem como inativar enzimas, como as polifenoloxidasas, que podem causar alterações de cor, sabor e aroma. O sapeco deve ser realizado logo após a colheita da erva-mate para garantir as características de cor, sabor e aroma do produto final (VALDULGA, 1995; PARANÁ, 2000).

A secagem da erva-mate é realizada a uma temperatura de 100 °C por aproximadamente 3 horas, ou até que a amostra atinja uma umidade de 5 %. Essa operação visa remover o excesso de água na erva-mate, evitando uma possível deterioração microbiológica e degradação enzimática (PARANÁ, 2000).

Segundo alguns autores, o processo de secagem de erva-mate diminui consideravelmente o teor de cafeína presente. Para maioria das indústrias ervateiras é vantajoso conservar na erva-mate quantidades elevadas de compostos fenólicos e metilxantinas (SCHMALKO; ALZAMORA, 2001; ESMELINDRO *et al.*, 2002) .

Após ser seca a erva-mate é triturada e passa a ser chamada de erva-mate cancheada, sendo esta a matéria-prima para fabricação da erva para chimarrão (PARANÁ, 2000). A erva-mate cancheada é uma mistura de diferentes proporções de folhas e palitos, dependendo do produto final esperado. Após a mistura, a erva-mate é moída com uma granulometria diferente para cada tipo de produto e acondicionada (VALDULGA; FINZER; MOSELE, 2003).

2.1.2 COMPOSTOS FITOQUÍMICOS PRESENTES NA ERVA-MATE

Vários compostos fitoquímicos são encontrados na erva mate, como por exemplo, metilxantinas, compostos fenólicos, saponinas (ALIKARIDIS, 1987).

Por muito tempo acreditou-se que somente as metilxantinas eram interessantes do ponto de vista farmacológico pela capacidade de estimular o sistema nervoso central (GONZALES *et al.*, 1993), sendo a cafeína a mais estudada. Porém hoje se conhecem também substâncias polifenólicas que apresentam atividade antioxidante (SCHINELLA *et al.*, 2000) na erva-mate.

Gugliucci; Menini (2003) relataram que a erva-mate auxiliou na inibição de plasminogênio e antitrombina, que estão relacionados com problemas vasculares decorrentes de diabetes. A erva-mate também auxilia na atividade hemaprotetora e digestiva (GORZALCZANY *et al.*, 2001).

A ingestão de bebidas a base de erva-mate, como o chimarrão, pode ser muito benéfica á saúde humana, visto que esta apresenta características como capacidade antioxidante, estimulação do sistema nervoso central, ação diurética,

entre outros benefícios (BRUNETON, 1991; SIMÕES *et al.*, 2001; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007)

O estudo dos compostos fitoquímicos da erva-mate, bem como sua caracterização e quantificação, vem se tornando de extrema importância para aumentar o apelo ao consumo da erva-mate. Mas o que vêm se demonstrando atualmente é que existe uma grande variação na composição química da erva-mate em um mesmo lote, sendo necessários mais estudos para determinar o que causa essas variações e tentar minimizá-las com a finalidade de padronizar os extratos de erva-mate, de acordo com a preferência dos consumidores (BORTOLUZZI *et al.*, 2006; CARDOSO JÚNIOR *et al.*, 2007).

2.2 METILXANTINAS

As metilxantinas estão sendo muito estudadas devido ao interesse das indústrias em suas propriedades farmacológicas, ou seja, elas são estimulantes do sistema nervoso central, inibindo o sono e diminuindo a sensação de fadiga, além de atuarem nos sistemas cardiovascular, renal e digestivo (VALDUGA, 1995).

As metilxantinas são constituintes químicos encontradas em várias bebidas alimentícias não alcoólicas ou bebidas estimulantes, como por exemplo, café, chá, chimarrão, guaraná, entre outros, com grande importância econômica e cultural (RATES; SIMÕES, 2004).

As metilxantinas são geralmente consideradas como pseudoalcalóides, devido ao fato das mesmas serem originadas de bases purínicas, com caráter anfótero. Porém, muitos autores consideram as metilxantinas como alcalóides verdadeiros, denominados alcalóides purínicos, devido à sua atividade biológica marcante, distribuição restrita e presença de nitrogênio heterocíclico (RATES; SIMÕES, 2004).

As principais metilxantinas (Figura 3) presentes na erva-mate são a cafeína (1,3,7 trimetilxantina), teobromina (3,7 dimetilxantina) e a teofilina (1,3 dimetilxantina) (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1990; ASHIHARA; SUZUKI, 2004; GNOATTO *et al.*, 2007).



FIGURA 3 - PRINCIPAIS METIXANTINAS PRESENTES NA ERVA-MATE
 FONTE: SALDANÃ *et al.* (1999)

A cafeína foi isolada primeiramente dos grãos de café por F. Runge, em 1820. A teofilina foi isolada por A. Kossel, em 1888, e a teobromina foi isolada das sementes de cacau por Woskresensky, em 1842. As estruturas das metilxantinas foram explicadas em 1897 por E. Fischer (STEFANOVICH, 1989)

Os precursores biogenéticos das metilxantinas podem ser bases púricas livres, como hipoxantina, adenina, guanina e também nucleosídeos, sendo a adenina o precursor mais importante (SUZUKI; ASHIHARA; WALLER, 1992).

A rota da cafeína foi proposta primeiramente em 1975 por Susuki e Takahashi e em 1996 foi confirmada por Ashihara *et al.* (1996). A rota principal da cafeína em plantas superiores é regulada pela enzima N-metiltransferase. A síntese da cafeína ocorre em tecidos jovens e a cafeína encontra-se nos cloroplastos das folhas em desenvolvimento armazenadas no vacúolo celular (ASHIHARA, 1993; KOSHIISHI; CROZIER; ASHIHARA, 2001).

As metilxantinas são solúveis em água e soluções aquosas ácidas a quente e etanol a quente, solventes orgânicos clorados e soluções alcalinas (BRUNETON, 1993; RATES; SIMÕES, 2004).

A diferenciação entre cafeína, teofilina e teobromina pode ser feita em função de sua solubilidade, temperatura de sublimação e faixa de fusão dos respectivos sublimados como demonstrado na Tabela 1 (THE MERCK ÍNDEX, 1996; RATES; SIMÕES, 2004).

A cafeína também apresenta ação analgésica, antipirética e antigripal, sendo encontrada em medicamentos para esses fins, atuando também sobre a musculatura estriada, estimulando a contração e reduzindo a fadiga muscular. A teofilina atua na contração do tecido muscular, fortalecendo a ação muscular. A teobromina induz o relaxamento não específico da musculatura brônquica, das vias biliares e das uretras. (BRUNETON, 1991; SIMÕES *et al.*, 2001; NIETSCHE, 2002).

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICAS DAS PRINCIPAIS METILXANTINAS

METILXANTINA	SOLUBILIDADE	SUBLIMAÇÃO	FAIXA DE FUSÃO
Cafeína	Água fria e (1/100) de água fria: etanol; ou cloroformio; eter etílico; tetracloreto de carbono.	Cristais prismáticos 178-180°C	235-237,5°C
Teofilina	Água fervente e em etanol. Levemente solúvel em água fria, etanol e clorofórmio.	Funde sem sublimar	269-274°C
Teobromina	Soluções ácidas ou alcalinas. Levemente solúvel em água fria ou fervente e em etanol.	Cristais aciculares pequenos 290-295°C	350°C

FONTE: RATES; SIMÕES, 2004

A toxicidade e os efeitos adversos da cafeína têm sido objeto de intensos estudos. A dose letal é estimada em 5 a 10 g para adultos de 70 kg (REYNOLDS, 1993; RATES; SIMÕES, 2004). Efeitos indesejáveis podem surgir a partir da ingestão de 1g de cafeína, entre eles destacam-se: dores de cabeça, nervosismo, cansaço, taquicardia, diurese e contração muscular (RATES; SIMÕES, 2004).

De acordo com a literatura os teores em erva-mate de cafeína e teobromina, analisados por CLAE, apresentam variações de 0,20 a 21,46 mg g⁻¹; 0,47 a 8,80 mg g⁻¹, respectivamente (COELHO *et al.*, 2007; DUTRA, 2009; BERTÉ, 2011), sendo que esta variação está relacionada a variabilidade genética das populações de *I. paraguariensis* (REGINATTO *et al.*, 1999). Muitos outros fatores podem influenciar nos teores de metilxantinas, como idade da planta, luminosidade, período de colheita, época da poda. Essas variáveis vêm sendo estudadas com a finalidade de padronizar os teores de metilxantinas (REGINATTO *et al.*, 1999; COELHO; ATHAYDE; SCHENKEL, 2001; COELHO; MARIATH; SCHENKEL, 2002; DA CROCE, 2002; SCHUBERT *et al.*, 2006; CARDOZO JÚNIOR *et al.*, 2007).

Segundo Mazzafera; Yamaoka-Yano; Vitória (1996) o conteúdo de cafeína, teofilina e teobromina é maior em folhas jovens e frutos imaturos. Estudos de Filip *et*

al., (1998) e Filip; López; Ferraro (1999) demonstraram que a quantidade de metilxantinas é maior na variedade *I. paraguariensis* do que em outras variedades, a partir desta informação surgiu a possibilidade de identificar adulterações da erva-mate (REGINATTO *et al.*, 1999).

Alguns autores verificaram a influência da época do ano no teor de metilxantinas na erva mate. Para Coelho; Athayde; Schenkel (2001), as folhas colhidas no verão são as que apresentam maiores teores de cafeína e teobromina. Porém Da Croce (2002) e Schubert *et al.* (2006) mostraram que os teores de metilxantinas são mais elevados no mês de julho e vai decaindo com o decorrer dos meses, isso devido ao processo de biossíntese das plantas ser menor nessa época. A diferença nesses teores também varia em relação a estados, ou seja, no Rio Grande do Sul, de fevereiro a setembro há um aumento no teor de cafeína na erva-mate, já no Mato Grosso do Sul ocorre o inverso (ATHAYDE; COELHO; SCHENKEL, 2000).

Outra variável que influencia os teores de metilxantinas encontrados na erva-mate é a etapa de extração das metilxantinas da erva-mate para análise. Para uma extração eficiente dos alcalóides purínicos da matriz são utilizados diferentes métodos como: infusão aquosa (BORTOLUZZI *et al.*, 2006), extração com ácido sulfúrico seguido de solventes orgânicos (REGINATTO *et al.*, 1999), por decocção e extração com solventes orgânicos (COELHO *et al.*, 2007). Segundo GNOATTO *et al.* (2007) a extração ácida por decocção mostrou-se mais eficiente para liberação de cafeína e teobromina, sendo também confirmado por Dutra; Hoffmann-Ribani (2007).

A seleção de progênies com alto teor de cafeína e teobromina, responsáveis pelo efeito estimulante e tônico da erva-mate, é um parâmetro fundamental para desenvolvimento de produtos que buscam estes efeitos. Mas, com o aumento da procura por produtos descafeínados, a seleção de progênies com baixo teor de cafeína pode ser uma alternativa aos consumidores tradicionais do chimarrão que apresentam cardiopatias, problemas de insônia ou ansiedade, agravados pela ação estimulante da cafeína (NAKAMURA, 2008).

Devido a uma controvérsia em relação ao teor mínimo de cafeína nos produtos, a legislação que exigia o teor mínimo de 0,5% foi revogada em 2002 quando foi estabelecido apenas um valor máximo para os produtos declarados como descafeinados (BRASIL, 2002; GNOATTO *et al.*, 2007).

2.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR)

Os primeiros trabalhos realizados com a utilização da espectroscopia de infravermelho próximo como ferramenta industrial foram realizados por Karl Norris no Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, na década de setenta (WILLIAMS; NORRIS, 1998).

A região do infravermelho corresponde ao intervalo de comprimento de onda de 12800 a 10 cm^{-1} . Esta região se divide em infravermelho próximo (NIR), médio (MID) e distante (FAR) (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). A Tabela 2 apresenta os limites aproximados de cada região.

TABELA 2 - REGIÕES ESPECTRAIS DO INFRAVERMELHO

Região	Intervalo de número de onda (cm^{-1})	Região do comprimento de onda (nm)	Região de freqüência (Hz)
Próximo (NIR)	12800 a 4000	780 a 2500	$3,8 \times 10^{14}$ a $1,2 \times 10^{14}$
Médio (MIR)	4000 a 200	2500 a 5000	$1,2 \times 10^{14}$ a $6,0 \times 10^{12}$
Distante (FAR)	200 a 10	5000 a 10000	$6,0 \times 10^{12}$ a $3,0 \times 10^{11}$

FONTE: SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002.

Na região do infravermelho próximo as principais aplicações encontram-se nas indústrias agrícolas, farmacêuticas, alimentícias, petroquímicas, (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). Inicialmente as medidas eram feitas em fotômetros e em espectrofotômetros dispersivos baseados em filtros e redes de difração, respectivamente. Atualmente modernos equipamentos com Transformada de Fourier, vêm sendo desenvolvidos especificamente para análises nesta região e já se encontram disponíveis acessórios para análises de amostras sólidas, líquidas e gasosas (VALDERAMA, 2005).

A espectroscopia NIR é capaz de fornecer resultados rápidos, sendo um método não destrutivo, sem geração de subprodutos tóxicos, por não utilizar reagentes químicos na análise, bem como necessita de uma preparação simples da amostra a ser analisada. Uma desvantagem desta técnica é a baixa sensibilidade a

constituintes presentes em pequenas concentrações (BURNS; CIURCZAK, 2001; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

As informações contidas no espectro NIR podem ser utilizadas para quantificação de alguma substância presente na amostra, bem como, a estimativa de propriedades físicas, quando é possível de alguma forma relacioná-la com alterações significativas nas características espectrais (PASQUINI, 2003).

A absorção da radiação NIR está restrita a espécies moleculares que apresentem diferenças de energia entre os estados vibracionais e rotacionais, já que este tipo de radiação não é suficientemente energética para causar transições eletrônicas em moléculas. Para absorver radiação infravermelha a molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo com consequente variação no movimento vibracional ou rotacional. Apenas nessas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos. O momento dipolar é determinado pela magnitude da diferença de carga e a distância entre os dois centros de carga (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Quando uma molécula que apresenta variação no momento dipolar vibra, ocorre uma vibração regular do momento dipolar surgindo um campo que pode interagir com o campo elétrico da radiação. Para que ocorra uma transferência efetiva de energia, resultando em uma variação da amplitude de vibração molecular com consequente absorção de energia, é necessário que a frequência da radiação coincida exatamente com a frequência vibracional natural da molécula. Em moléculas homonucleadas, tais como O_2 , N_2 ou Cl_2 , não ocorre absorção de energia no infravermelho, pois estas não apresentam variação efetiva no momento de dipolo durante a vibração ou rotação (COATES, 1999; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

O estudo do comportamento vibracional de uma molécula é normalmente descrito pelo modelo que descreve a molécula como duas massas esféricas conectadas por uma mola de massa desprezível, qualquer perturbação no estado de equilíbrio resulta em uma vibração da molécula conhecido como movimento harmônico simples (OZAKI *et al.*, 2007).

As vibrações são divididas em duas categorias: *estiramentos* e *deformações angulares*. As deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações e podem acontecer no plano ou fora do plano da molécula. Além desses tipos de vibração, interações ou *acoplamentos* de vibrações podem ocorrer

se as vibrações envolverem ligações de um mesmo átomo central e o resultado disso é uma variação nas características das vibrações envolvidas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

O espectro NIR está associado à anarmocidade das ligações envolvendo átomos de hidrogênio que conseguem vibrar com maior amplitude devido a sua pequena massa molecular e grande momento de dipolo quando estão ligados a átomos de carbono, nitrogênio e oxigênio (COSTA FILHO, 2003).

Para a região NIR, os sinais vibracionais observados são devido à sobretons e bandas de combinação de estiramento e de deformações angulares de transições fundamentais de ligações C-H, N-H e O-H (WORKMAN JR; KOWALSKI; BRO, 1996).

Os sobretons são transições vibracionais e não consecutivas. Estes se caracterizam por apresentarem intensidades mais fracas do que as apresentadas entre o estado fundamental e o primeiro estado excitado da molécula (COSTA FILHO, 2003).

As bandas de absorção que se referem aos sobretons tendem a ocorrer em aproximadamente metade e um terço do seu comprimento de onda fundamental (SOUZA, 2005). A Tabela 3 mostra as principais regiões espectrais do NIR e a natureza da transição vibracional associada a elas.

O espectro NIR varia com alguns parâmetros físicos, como por exemplo, tamanho das partículas, umidade, temperatura e compactação da amostra (COSTA FILHO, 2003).

Quando uma amostra é irradiada por radiação NIR, a radiação incidente pode ser refletida, absorvida ou transmitida, sendo que a contribuição relativa de cada fenômeno depende da constituição química e parâmetros físicos da amostra (DAVIES, 2000). Embora a radiação penetre no produto, suas características espectrais mudam devido ao espalhamento da radiação e dos processos de absorção. As propriedades de espalhamento da luz estão relacionadas com a estrutura da amostra analisada (NICOLAI, 2007).

TABELA 3 - ATRIBUIÇÃO DAS REGIÕES ESPECTRAIS ÀS POSSÍVEIS TRANSIÇÕES VIBRACIONAIS

Região espectral (nm)	Natureza da transição vibracional
2200 – 2450	Combinação de estiramento C-H
2000 – 2200	Combinação de estiramento N-H, O-H
1650 – 1800	Primeiro sobretons do estiramento C-H
1400 – 1500	Primeiro sobretons de combinações N-H, O-H
1110- 1225	Segundo sobretons de estiramento C-H
950 – 1100	Segundo sobretons de combinações N-H, O-H
850 – 950	Terceiro sobretons de estiramento C-H
775 – 850	Terceiro sobretons de combinações N-H, O-H

FONTE: COSTA FILHO, 2003.

A interação da radiação eletromagnética pode ser interpretada de forma que cada partícula no sistema granular atue com um ponto de espalhamento, onde a interação luz/partícula afete a vizinhança. Os fenômenos de reflexão, absorção, transmissão, refração ou difração podem ocorrer com a incidência do feixe de luz sobre a amostra (BURNS; CIURCZAK, 2001; COSTA FILHO, 2003). Estes fenômenos estão ilustrados na Figura 4.

Para a determinação dos constituintes de amostras sólidas particuladas, a reflectância tornou-se uma ferramenta de grande importância para medidas na região NIR (WILLIAM; NORRIS, 1998). Na reflectância, a referência é um corpo branco que reflete toda a radiação incidente. O caminho percorrido pela luz varia de acordo com o tamanho da partícula e o índice de refração (FIDÊNCIO, 2001). O método por reflectância pode apresentar acessórios para a obtenção de espectros por Reflectância Total Atenuada (ATR), Reflectância Especular e Reflectância Difusa (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

A técnica que utiliza a reflectância difusa é conhecida como DRIFTS (*Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy*), pode ocorrer em superfícies não totalmente planas e o substrato pode ser contínuo ou fragmentado (CORDEIRO, 2006).

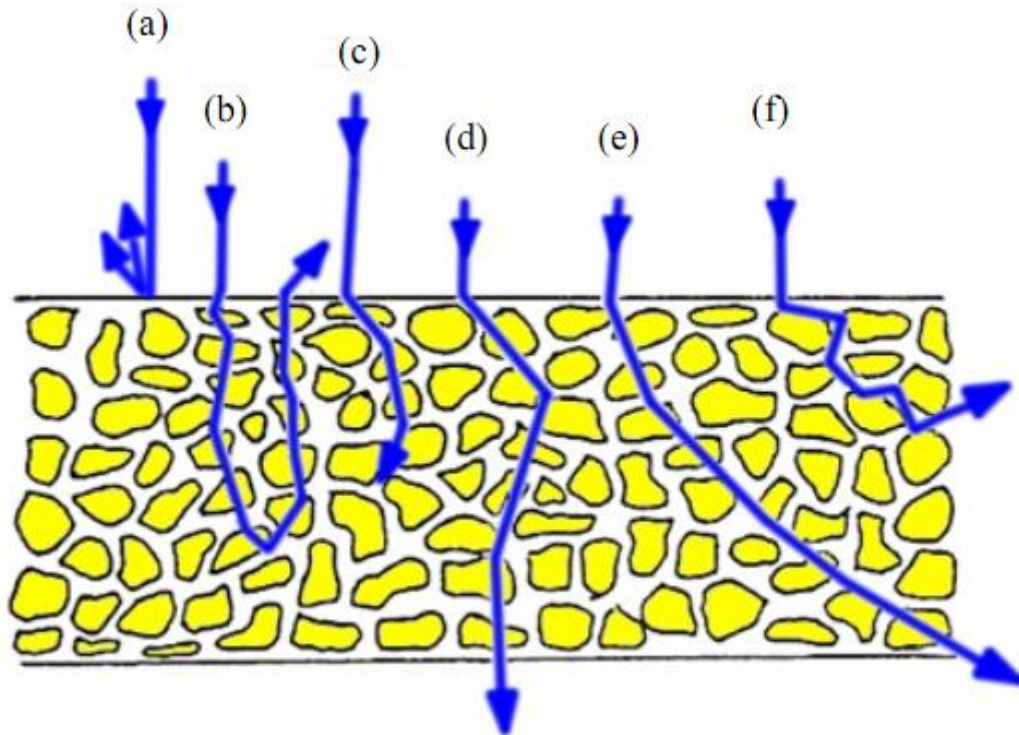


FIGURA 4 - INTERAÇÃO DA RADIAÇÃO NIR COM PARTÍCULAS SÓLIDAS DA AMOSTRA.
 NOTA: (A) REFLECTÂNCIA ESPECULAR, (B) REFLECTÂNCIA DIFUSA, (C) ABSORÇÃO, (D) TRANSMITÂNCIA, (E) REFRAÇÃO, (F) ESPALHAMENTO.
 FONTE: PANERO, 2008.

A definição de reflectância é dada como sendo a razão das potências ou fluxos luminosos da radiação refletida (I_R) e da radiação de referência (I_0) em uma superfície. Assim, para medir a reflectância, deve-se comparar a quantidade medida com a referência de acordo com a Equação (1) (BURNS; CIURCZAK, 2001; FIDÊNCIO, 2001):

$$R = \frac{I_R}{I_0} \quad (1)$$

A reflectância e os equipamentos que operam na região do infravermelho próximo são designados de espectroscopia de reflexão no infravermelho próximo (FERRÃO, 2000).

O processo de reflexão está baseado na interação que ocorre entre o feixe de luz incidente com a matriz analisada, onde a luz penetra na superfície e sofre absorção parcial e também múltiplos espalhamentos, retornado em seguida para a superfície da amostra. A Figura 5 mostra esse processo. A radiação incidente sofre

enfraquecimento após entrar em contato com a amostra várias vezes, essa reflexão difusa, que são os raios que saem da superfície após terem penetrado na matriz, é a que fornece as informações sobre a amostra. A reflexão difusa ocorre em superfícies não totalmente planas (FERRÃO, 2000, FIDÊNCIO, 2001; COSTA FILHO, 2003).

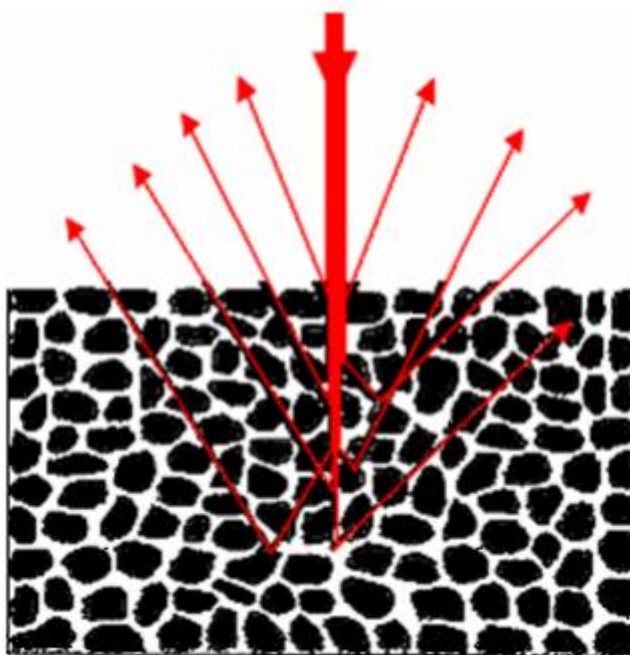


FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO DA REFLEXÃO DIFUSA DE UMA ONDA ELETROMAGNÉTICA EM UMA AMOSTRA PARTICULADA
 FONTE: MESSERSCHIMIDT, 1999.

Em um experimento além da reflexão difusa pode ser observada também a reflexão especular, sendo esta de maior intensidade nas regiões onde a amostra apresenta forte absorção, o que pode levar a distorções no espectro (FERRÃO, 2001).

A intensidade espectral não está linearmente relacionada com a concentração do composto analisado. Assim, para análise das informações quantitativas é necessário utilizar funções e fórmulas complexas. Uma das funções usadas é conhecida como Kubelka-Munk (Equação 2), que relaciona os espectros de reflectância com a concentração das moléculas na amostra e transforma o espectro de reflectância difusa em um espectro semelhante ao de absorção (FERRÃO, 2001).

$$f(R_d) = (1 - R_d)^2 / 2 R_d \quad (2)$$

Onde: R_d é a reflectância difusa

De acordo com a teoria, $f(R_\alpha)$ esta relacionada com o coeficiente de absorção (K) e com o coeficiente de dispersão da superfície da amostra (S), expressa conforme a Equação 3.

$$f(R_\alpha) = K / S \quad (3)$$

Onde: K = coeficiente de absorção;
S = coeficiente de dispersão da superfície da amostra.

O efeito do tamanho da partícula causa deslocamento da linha de base e se torna muito pronunciado em comprimentos de ondas de grande absorção pela amostra. Por exemplo, em duas amostras com mesma composição, mas diferente granulometria há maior reflexão difusa nas partículas menores (MESSERSCHMIDT, 1999).

Um espectrofotômetro NIR está representado na Figura 6. A fonte de radiação contínua (normalmente uma lâmpada halogênea de tungstênio) irradia energia na amostra, contida em um porta amostra (geralmente de quartzo ou sílica fundida), passando por um seletor de comprimento de onda (monocromador), um detector de radiação que converte a energia luminosa em energia elétrica e um dispositivo para ler a resposta do detector, com Transformada de Fourier (STRATIS *et al.*, 2001).



FIGURA 6 - COMPONENTES BÁSICOS DE UM EQUIPAMENTO QUE OPERA NA REGIÃO DO NIR
FONTE: O autor (2012).

A região espectrofotométrica do NIR produz espectros de absorção complexos, onde não se encontram bandas bem definidas para diferentes grupos funcionais (BJORSVIK, 1996).

Com a introdução de feixes de fibra ótica para a transmissão da luz, ocorreu a consagração da técnica de infravermelho próximo, fazendo com que a espectroscopia deixasse de ser uma técnica apenas de laboratório e passasse a ser

implantada dentro dos processos industriais em conjunto com a análise multivariada dos dados (SIESLER, 1991).

2.4 ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS

Após a segunda metade da década de 60, com o surgimento de métodos instrumentais computadorizados na análise química, gerando uma grande quantidade de dados de forma rápida e fácil, surgiu a necessidade de tratar estes dados e extrair o maior número de informações possíveis dos dados gerados. Assim iniciou-se a pesquisa e utilização de métodos matemáticos e estatísticos que resultaram na quimiometria (OTTO, 1999; FERREIRA *et al.*, 1999).

A quimiometria se divide em diferentes aplicações de acordo com Otto (1999):

- a. Processamento de sinais analíticos;
- b. Planejamento e otimização de experimentos;
- c. Reconhecimento de padrões e classificação de dados;
- d. Calibração multivariada;
- e. Métodos de inteligência artificial.

Devido ao comportamento não muito específico dos espectros obtidos na espectroscopia de infravermelho próximo, onde é possível observar picos de absorção largos e sobrepostos, a região do NIR foi considerada por muito tempo de difícil compreensão. Para uma melhor interpretação do NIR foram desenvolvidas técnicas multivariadas para análise dos dados dos espectros, tais como análise dos componentes principais (PCA) e regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), que possibilitam a análise de todo o espectro para a construção de modelos de calibração (HALL *et al.*, 1996).

A calibração multivariada tem como base estabelecer uma relação entre duas matrizes ou blocos de dados químicos, quando as propriedades que descrevem as mesmas apresentarem alguma dependência entre si (CORDEIRO, 2006).

A calibração e a previsão são as duas fases das quais consiste a análise multivariada (MARTENS, 1989; FERREIRA *et al.*, 1999). Durante a fase de

calibração são obtidos “n” espectros para um conjunto de amostras conhecidas em “p” comprimentos de onda diferentes, formando uma matriz de “p” colunas e “n” linhas, denominada de **Xcal**. Também uma matriz **Ycal** com os valores de concentrações pode ser formada contendo “n” linhas, correspondendo as diferentes amostras, e “q” colunas, indicando o número de diferentes espécies de interesse presentes nas amostras.

O passo seguinte é desenvolver um modelo matemático apropriado, determinando-se um vetor dos coeficientes de regressão (**b**) que melhor possa reproduzir **Ycal** a partir dos dados da matriz **Xcal** (Equação 4). Esse modelo é utilizado na fase de previsão (com um conjunto teste) para estimar as concentrações (**Yprev**) dos constituintes de novas amostras, a partir de seus espectros (**Xteste**) (Equação 5). Como estas metodologias trabalham com matrizes de dados, o processo de isolar o fator **Y** da equação 4 para a obtenção da equação 5, implica a utilização da matriz transposta de **X**, ou seja, **(Xteste)^t** (NAGATA; BUENO; PERALTA-ZAMORA, 2001).

$$Xcal = b \cdot Ycal \quad (4)$$

$$Y(teste) = X(teste)^t \cdot b \quad (5)$$

A Figura 7 ilustra a maneira como os dados para a calibração podem ser organizados. A concentração das amostras corresponde as variáveis dependentes, enquanto que os valores de absorbância dos espectros, a cada comprimento de onda, representam as variáveis independentes.

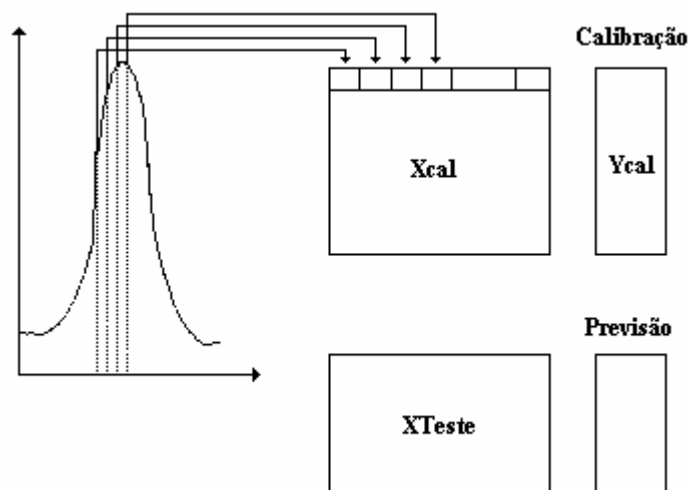


FIGURA 7 – ORGANIZAÇÃO DOS DADOS PARA CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA
 FONTE: NAGATA, 2001.

Esses métodos de análise multivariada vêm sendo muito empregados para controle de qualidade em indústrias alimentícias em conjunto com a espectroscopia NIR, bem como na substituição de métodos tradicionais de quantificação para um determinado parâmetro de qualidade (FERRÃO, 2000).

2.4.1 Pré- Processamentos Espectrais

A eficiência dos modelos multivariados pode ser melhorada através do emprego de pré-processamentos de dados espectrais. Durante a obtenção dos espectros podem ocorrer distorções espectrais, como falhas de varredura, ruídos, entre outros que podem ser amenizados pela aplicação dos pré-processamentos espectrais (ALMEIDA, 2009).

Dentre os pré-processamentos utilizados podem ser citados:

a) Derivação

A derivação tem por objetivo corrigir problemas com linhas base dos espectros, bem como remover os ruídos e melhorar definições de bandas que se encontram sobrepostas (OSBORNE, 2000). As informações contidas ao longo dos diferentes comprimentos de onda são geralmente acentuadas com aplicação da primeira ou segunda derivada (FERRÃO, 2000; MORGANO et al., 2005; CHEN et

al., 2006). A principal desvantagem deste processo é que o ruído, presente nos espectros pode ter seu valor amplificado, o que diminui a relação sinal/ruído (SOUZA, 2005), desta forma é muito empregado o alisamento junto com a derivação.

b) Alisamento

Esta técnica tem como objetivo suavizar o ruído que acompanha o sinal analítico. Primeiramente os dados espectrais são separados em grupos contendo um número fixo de elementos, onde é calculado o valor médio. Em seguida, ajusta-se o valor médio no modelo polinomial, através dos mínimos quadrados. Assim, os ruídos são reduzidos pela raiz quadrada do número de pontos utilizados, geralmente este procedimento é realizado através do algoritmo de Savitzky-Golay (SAUR, 2007; RINNAN *et al.*, 2009).

c) Correção Multiplicativa do Sinal (MSC)

Auxilia na correção das variações do espalhamento da luz ocasionadas pelas medidas de reflectância difusa, que ocorrem principalmente pela falta de homogeneidade da amostra, diferenças na granulometria (FERRÃO, 2000; COSTA FILHO, 2003; ROGGO *et al.*, 2007). Esse método matemático minimiza a interferência através da correção da linha base dos espectros de modo que todos os espectros apresentem o espalhamento “ideal”, ou seja, o espalhamento médio de todos os espectros do conjunto de calibração (AZZOUZ *et al.*, 2003; PIZARRO *et al.*, 2004). Em seguida, uma regressão linear é usada para calcular o coeficiente angular e linear do gráfico entre o espectro ideal e o espectro que vai ser corrigido. Para calcular o espectro corrigido, subtrai-se cada ponto do espectro pelo valor do coeficiente linear e divide este pelo coeficiente angular (RIBEIRO, 2009).

d) Transformação Padrão Normal de Variação (SNV)

É um método utilizado para corrigir as interferências de espalhamento e os efeitos do espalhamento multiplicativo entre diferentes amostras (AZZOUZ *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2004). A SNV apresenta função análoga à MSC, porém a correção por SNV remove o espalhamento através da normalização de cada espectro pelo desvio padrão, não havendo a necessidade de um espectro “ideal” para fazer as correções dos espectros (PIZARRO *et al.*, 2004; COSTA FILHO, 2003).

2.4.2 Análise de Componentes Principais (PCA)

A PCA é um método matemático de tratamento de dados baseado em álgebra linear o qual corresponde à decomposição da matriz de dados X , de dimensão $m \times n$, no produto de duas matrizes, a matriz dos *scores* T e a transposta da matriz dos *loadings* L^T como mostrado na Equação (6):

$$X = TL^T \quad (6)$$

A PCA é utilizada para a transformação de dados complexos, com a finalidade de extrair informações relevantes do conjunto de dados e torná-las de fácil interpretação. O conjunto de componentes principais (CPs) é constituído a partir da combinação linear dos dados originais, criando assim novos eixos no espaço multidimensional que são ortogonais entre si e construído em ordem decrescente da quantidade de variância que descrevem (SOUZA, 2005).

Através do PCA uma amostra com natureza multivariada pode ser representada por um número pequeno de dimensões, sendo muito utilizado para verificar a presença de grupos distintos no lote de amostras, na construção dos conjuntos de calibração e validação (ALMEIDA, 2009).

Normalmente, a variação máxima dos dados pode ser explicada pela primeira CP, e a cada sucessiva CP a variabilidade residual do conjunto de dados, de modo que a variação total seja descrita ao reunir todas as CPs (SOUZA, 2005).

Em síntese, a análise dos componentes principais é um método que tem por finalidade básica, a redução de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais, sendo por isso muito utilizado em espectroscopia NIR, uma vez que os espectros com mais de mil variáveis podem ser vistos em duas dimensões. Para além de que este modelo permite ainda que só a informação relevante permaneça, excluindo, por exemplo, variações associadas ao ruído (GELADI; KOWALSKI, 1986; ALMEIDA, 2009).

Para determinar o número mínimo de CP a utilizar existem vários critérios, entre eles a percentagem de variância explicada, o critério do valor próprio, *scree-test* e a validação cruzada (ALMEIDA, 2009).

2.4.3 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

O método de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) é considerado o método de calibração multivariada mais utilizado para a construção de modelos de calibração a partir de dados de primeira ordem (GELADI; KOWALSKI, 1986; HOSKULDSSON, 1988) .

De maneira semelhante ao PCA, o PLS decompõe as matrizes de dados X e Y de forma que cada CP do modelo busque a máxima covariância entre X e Y, passando a ser chamada de variável latente (VL) (OTTO, 1999).

Este método apresenta as vantagens de utilizar um maior número de informações obtidas de cada amostra, diminuindo o valor do erro de análise e permitindo determinações simultâneas até mesmo na presença de espécies interferentes, o que faz dele um método mais robusto em relação a outros métodos matemáticos empregados atualmente (SOUZA, 2005).

Durante a construção do modelo de calibração deve-se escolher um número de VL que proporcionem o menor erro de previsão possível, sendo as matrizes das variáveis independentes (X) representadas pelos *scores* e *loadings* conforme a Equação 7 (MORGANO *et al.*, 2007).

$$X = TP + E \quad (7)$$

Onde, T representa os *scores*, P os *loadings*, E sendo a matriz de erros da decomposição de “X”, quando a matriz “X” é decomposta.

O desempenho do método vai depender do número de VL selecionadas para a construção do modelo de calibração (PASTI *et al.*, 1998).

A otimização de um modelo PLS consiste em determinar o número ótimo de VL a serem mantidos no modelo. Se por um lado a seleção de muitos fatores aumenta o risco de introdução de ruído no modelo, por outro lado, a seleção de

poucos fatores pode causar a perda de informação relevante. (DESPAGNE; MASSART, 1987).

A escolha do número ideal de VL é feita através do método de validação cruzada, denominada de “*Leave one out*”. Neste método uma das amostras do conjunto de calibração é excluída da fase de desenvolvimento do modelo, sendo reservada como elemento de previsão. Este processo é repetido n vezes, de maneira a permitir que todos os padrões de calibração (n) participem como elementos de previsão. Finalmente, o erro de previsão (RMSECV) é obtido comparando-se a concentração prevista para cada padrão com o seu valor verdadeiro, valor este que é apresentado em função do número de VL utilizada na elaboração dos modelos (FERREIRA *et al*, 1999).

A otimização dos modelos multivariados pode ser realizado também pela identificação de anomalias no conjunto de calibração. As amostras anômalas ou *outliers* podem ser identificadas pela utilização de dois parâmetros, leverage e resíduos de Student. O primeiro representa a influência de cada uma das amostras no modelo de regressão, apresentando um valor limite equivalente a $3 \text{ VL}/n$ (onde VL representa o número de variáveis latentes e n o número de amostras), enquanto que o segundo indica se a amostra está dentro da distribuição normal com um nível de confiança de 95%, admitindo-se como limite valores de $\pm 2,5$ (FERREIRA *et al*, 1999).

Após a construção do modelo de calibração multivariada, pode-se utilizar uma série de amostras externas para verificar a capacidade de previsão do modelo. Uma forma de validar o modelo é usar um conjunto de amostras de referência (validação externa), de composição diferente das amostras que compunham o conjunto de calibração, porém que sejam representativas da população com a finalidade de determinar o modelo com o menor erro de previsão possível (MARTENS; NAES, 1996).

2.4.4 Aplicação da Espectroscopia NIR

A espectroscopia NIR foi aplicada na determinação do teor de cinzas, proteínas e número de queda em amostras de farinha de trigo. Para o

desenvolvimento dos modelos de calibração foram utilizadas 100 amostras, onde foram aplicados diferentes pré-processamentos nos espectros NIR. O modelo de calibração foi avaliado através do valor de SEV (standard error of validation). Os melhores resultados foram obtidos quando da utilização simultânea dos dados centrados na média e escalados por variância, onde foi possível obter um modelo adequado para a previsão simultânea dos teores de cinzas, de proteína e número de queda para amostras de farinha de trigo (FERRÃO, 2000).

A aplicação do NIR para a estimativa da maturação de uvas para a produção de vinhos é uma operação de baixo custo. Através da utilização do PLS, utilizando diferentes pré-processamentos espectrais foi possível estimar o teor de sólidos solúveis em uvas finas. O desempenho dos modelos foi avaliado através dos valores de RMSEPs e R^2 . Os modelos desenvolvidos para uvas brancas apresentaram melhores resultados (HERRERA; GUESALAGA; AGOSIN, 2003).

A espectroscopia NIR foi utilizada como uma ferramenta online para classificação de presuntos curados. Amostras de presuntos foram avaliadas em diferentes atributos sensoriais, como cor e consistência, por julgadores treinados. Através dos dados sensoriais, dos espectros NIR e de análises multivariadas foram desenvolvidos modelos de calibração para cada atributo sensorial para tomadas de decisões precisas durante as etapas de fabricação e cura de presunto (ORTIZ *et al*, 2006).

O teor de cafeína em chá verde foi avaliado por FT-NIR. Um modelo de calibração foi desenvolvido usando padrões puros de cafeína em diferentes concentrações. O melhor modelo desenvolvido apresentou valores de R^2 e SEP de 0,98 e 2,0, respectivamente, com 6 variáveis latentes. A espectroscopia FT-NIR foi válida para a quantificação de cafeína em chá verde (SINIJA; MISHRA. 2009).

Em amostras de erva-mate, a espectroscopia NIR em conjunto com a calibração multivariada foi utilizada para discriminar amostras de diferentes regiões, através da PCA (COZZOLINO; RESTAINO; FASSIO, 2010).

Um dos parâmetros analisados na indústria ervateira são os teores de metilxantinas, sendo a CLAE a técnica mais empregada para análise de metilxantinas em erva-mate. Porém esta é uma análise demorada, destrutiva e cara, devido aos reagentes químicos necessários e complexa preparação da amostra, sendo assim, uma técnica de difícil execução na rotina da indústria ervateira. Visto que a espectroscopia NIR vem sendo muito aplicada na área de alimentos, esta

pode ser uma alternativa eficaz para a quantificação de metilxantinas em erva-mate de forma rápida, sem destruição da amostra e sem geração de resíduos.

O desenvolvimento e validação de modelos de calibração multivariada possibilitam o controle de qualidade online, permitindo tomadas de decisões rápidas durante o processamento de erva-mate.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRA DE ERVA-MATE

Neste trabalho foram utilizadas 25 amostras fornecidas pela Embrapa – Florestas de Colombo – PR. As amostras utilizadas eram provenientes da região de Prudentópolis- PR.

As amostras recebidas já estavam secas em micro-ondas e moídas. Estas foram acondicionadas em sacos de polipropileno sob-refrigeração para posteriormente serem submetidas às análises

3.2 ANÁLISE DAS METILXANTINAS

3.2.1 Reagentes

Padrões de cafeína e teobromina foram adquiridos da Sigma Chemicals Co.® (St. Louis, EUA). O metanol grau cromatográfico e o ácido sulfúrico foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Utilizou-se um sistema Milli-Q da Millipore (Bedford, USA) para purificar a água utilizada no preparo das soluções padrão e fase móvel. Foi utilizada membrana filtrante com poros de 0,45 µm da Millipore (Bedford, USA).

3.2.2 Extração das Metilxantinas

Amostras de 2 g de erva-mate foram pesadas em beakers de 100 mL, adicionadas de 4 mL de ácido sulfúrico, homogeneizadas e deixadas em banho-maria por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 50 mL de água quente, mantendo

as amostras em banho-maria por mais 15 minutos, após este tempo as amostras foram filtradas em papel filtro qualitativo. Os extratos foram resfriados até a temperatura ambiente e neutralizados com hidróxido de sódio 40%, e transferidos para balão volumétrico de 250 mL, onde o volume foi completado com água destilada (BRASIL, 2005)

Os extratos contidos nos balões volumétricos foram filtrados em filtro de membrana com poros de 0,45 µm da Milipore para posterior análise no CLAE.

3.2.3 Preparo dos Padrões

Os padrões adquiridos da Sigma Chemicals Co.[®], foram preparados através da diluição de cada metilxantina em solução aquosa com metanol 50:50 (v/v) com concentrações de 1200 µg mL⁻¹, 50 µg mL⁻¹ para cafeína e teobromina, respectivamente. As curvas padrões de cafeína e teobromina foram obtidas por meio da análise de soluções metanólicas destes padrões nas concentrações de 0,492; 48; 96; 192; 384 µg mL⁻¹ para cafeína, 1; 4; 16; 21; 50 µg mL⁻¹ para teobromina. Todas as soluções padrão foram preparadas em triplicata, sendo previamente filtradas em membrana com poros de 0,45 µm da Milipore. As áreas dos picos foram medidas e as médias da área de cada triplicata foram plotadas em gráfico de concentração *versus* área, calculando o coeficiente de regressão linear da curva e a equação da reta.

3.2.4 Análise Cromatográfica das Metilxantinas

Para realização das análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Agilent 1200), constituído de um bombeamento quaternário de solvente (modelo G1322A), detector de arranjo de diodos (modelo G1315B), degaseificador *online* e sistema de processamento de dados *EZ Chrom Elite v. 3.3.1*. Coluna Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6 x 150 mm, 5 µm, operando em 272 nm e 254 nm. A fase móvel metanol e água (20:80 v/v) e uma vazão de 1 mL min⁻¹.

A quantificação dos extratos das amostras foi realizada por padronização externa e as determinações de cada amostra conduzidas em duplicata.

O limite de detecção (LD) foi definido pelo parâmetro da curva analítica, calculados como a mínima concentração $3,3 \times (SD/S)$, sendo SD (desvio padrão) o valor de três vezes a altura do ruído e S (slope) a inclinação da curva analítica (SHABIR, 2003). O valor do limite de quantificação (LQ) foi calculado por $3 \times LD$.

Avaliou-se a seletividade pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos na separação frente aos dos padrões, e pela comparação dos espectros com o dos respectivos padrões em um banco de dados.

3.3 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO

Os espectros de reflectância na região do infravermelho próximo foram coletados em um espectrômetro BRUKER – TENSOR 37, equipado com um acessório de reflectância difusa, sendo os sinais expressos em $\log (1/R)$. Os espectros das amostras foram obtidos em duplicata, por meio de esfera de integração com resolução de 4 cm^{-1} , 64 varreduras para cada espectro e a região espectral sendo de $4000\text{-}10000 \text{ cm}^{-1}$.

3.4 DESENVOLVIMENTOS DOS MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA

Modelos de calibração multivariada foram desenvolvidos para correlacionar os dados espectrais por NIR com os teores analíticos de cafeína, teobromina e metilxantinas totais (soma dos teores de cafeína e teobromina quantificados) das amostras de erva-mate.

Na construção dos modelos por calibração multivariada foi utilizado o método de regressão de mínimos quadrados parciais (PLS), utilizando o pacote PLS-toolbox 1.5 (Eigenvector Research Inc.), trabalhando em ambiente Matlab

versão 7.0 (Mathworks Inc.), aplicando o algoritmo NIPALS e validação cruzada *leave on out*.

A montagem das matrizes de dados e análise estatística foi realizada com o software Origin 8.0®.

Inicialmente foi realizado um PCA com os dados espectrais para montagem dos conjuntos de calibração e validação.

Após a determinação do conjunto de calibração, vários modelos foram desenvolvidos e em cada um foram testados diferentes pré-processamentos, como: derivação, alisamento, MSC, SNV.

A análise de amostras *outlier* ou anômalas foi realizada em cada um dos modelos, através da análise do número de *Leverage* e Resíduos de Student.

A escolha do melhor modelo de calibração para cafeína, teobromina e metilxantinas totais ocorreu pela análise dos valores de RMSECV, RMSEP e R². Após a determinação do modelo de calibração adequado este foi testado para as amostras do conjunto de validação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DAS METILXANTINAS

Os teores de metilxantinas encontrados nas 25 amostras de erva-mate analisadas por CLAE variaram entre 0,68 a 10,11 mg g⁻¹ para a cafeína, para a teobromina os teores variaram entre 0,5 e 5,03 mg g⁻¹. Em relação aos teores de metilxantinas totais, foram encontrados variações entre 3,69 a 12,76 mg g⁻¹. Estes valores estão dentro os relatados nos estudos de diversos autores como CLIFFORD, 1990; MAZZAFERA, 1994; COELHO *et al.*, 2007; DUTRA, 2009; BERTÉ, 2011), conforme Tabela 4, considerando os diferentes tipos de extração da amostra.

TABELA 4 - COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE METILXANTINAS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE PESQUISADAS POR DIVERSOS AUTORES

Autores	Tipo de extração	Cafeína (mg g⁻¹)	Teobromina (mg g⁻¹)
CLIFFORD (1999)	Extração alcoólica	8,90 a 17,30	4,50 a 8,80
MAZZAFERA (1994)	MgO	0,60 – 9,15	0,9 - 4,32
COELHO ET AL. (2007)	Decocção e solvente	0,20 a 21,46	0,47 a 8,45
DUTRA (2009)	Decocção/Acidificação	2,97 a 11,4	0,24 a 3,52
Presente trabalho	Decocção/Acidificação	0,68 a 10,11	0,5 e 5,03

Os valores das concentrações de metilxantinas nas amostras analisadas estão apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - CONCENTRAÇÕES DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E METILXANTINAS TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE, QUANTIFICADOS POR CLAE APÓS PRÉVIA EXTRAÇÃO (CONTINUA)

AMOSTRA	CAFEÍNA (mg g ⁻¹)	TEOBROMINA (mg g ⁻¹)	METILXANTINAS TOTAIS (mg g ⁻¹)
1 A	2, 61	3, 05	5, 66
1 B	2, 59	2, 78	5, 37
5 A	4, 62	3, 22	7, 84
5 B	4, 59	3, 17	7, 76
8 A	4, 75	0, 63	5, 38
8 B	4, 76	0, 69	5, 45
9 A	2, 03	3, 72	5, 75
9 B	2, 00	3, 72	5, 72
10 A	3, 22	1, 06	4, 28
10 B	3, 15	1, 37	4, 52
11 A	6, 43	0, 98	7, 35
11 B	6, 32	0, 97	7, 29
12 A	4, 36	1, 55	5, 91
12 B	4, 42	1, 81	6, 23
14 A	0, 88	5, 03	5, 91
14 B	0, 88	4, 85	5, 73
16 A	4, 33	0, 98	5, 31
16 B	4, 35	0, 99	5, 34
18 A	8, 34	3, 15	11, 49
18 B	8, 26	2, 82	11, 08
19 A	9, 38	3, 34	12, 72
19 B	9, 41	2, 95	12, 36
20 A	5, 34	4, 82	10, 16
20 B	5, 36	5	10, 36
22 A	4, 75	0, 02	4, 77
22 B	4, 71	0, 02	4, 72
24 A	5, 17	3, 08	8, 25
24 B	4, 31	3, 06	7, 37
25 A	2, 52	2, 36	4, 88
25 B	2, 65	2, 42	5, 07
26 A	7, 28	0, 5	7, 78
26 B	7, 31	0, 55	7, 86
27 A	4, 5	3, 84	8, 34
27 B	4, 31	3, 82	8, 13
28 A	7, 24	1, 43	8, 67
28 B	7, 25	1, 44	8, 69
30 A	2, 30	4, 49	6, 79
30 B	4, 19	4, 47	8, 66
31 A	1, 86	4, 86	6, 72
31 B	1, 86	5, 03	6, 89

TABELA 5 - CONCENTRAÇÕES DE CAFEÍNA, TEOBROMINA E METILXANTINAS TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE, QUANTIFICADOS POR CLAE APÓS PRÉVIA EXTRAÇÃO (CONCLUSÃO)

32 A	3, 51	1,34	4.85
32 B	3, 5	1, 27	4. 77
33 A	4, 68	4, 618	9. 30
33 B	4,64	4, 64	9. 28
35 A	0, 69	4, 25	4. 94
35 B	0,68	3, 88	4. 56
37 A	0,001	3. 69	3. 69
37 B	0,001	3,9	3,9
38 A	3, 85	4, 59	8. 44
38 B	3, 85	4,77	8,62
MÍNIMO	0, 001	0,02	3, 69
MÁXIMO	10, 11	5, 03	12, 72
MÉDIA ± DESVIO PADRÃO	4.13±2, 3	2, 82 ± 1.53	6, 98 ± 2,2

A Figura 8 apresenta um cromatograma típico da separação para uma das amostras de erva-mate analisadas.

Por meio da comparação dos tempos de retenção para os picos obtidos na separação frente aos dos padrões (Figuras 9 e 10) e dos espectros obtidos na separação com os espectros dos padrões, confirmou-se a seletividade e a separação eficiente das metilxantinas, teobromina e cafeína nas amostras.

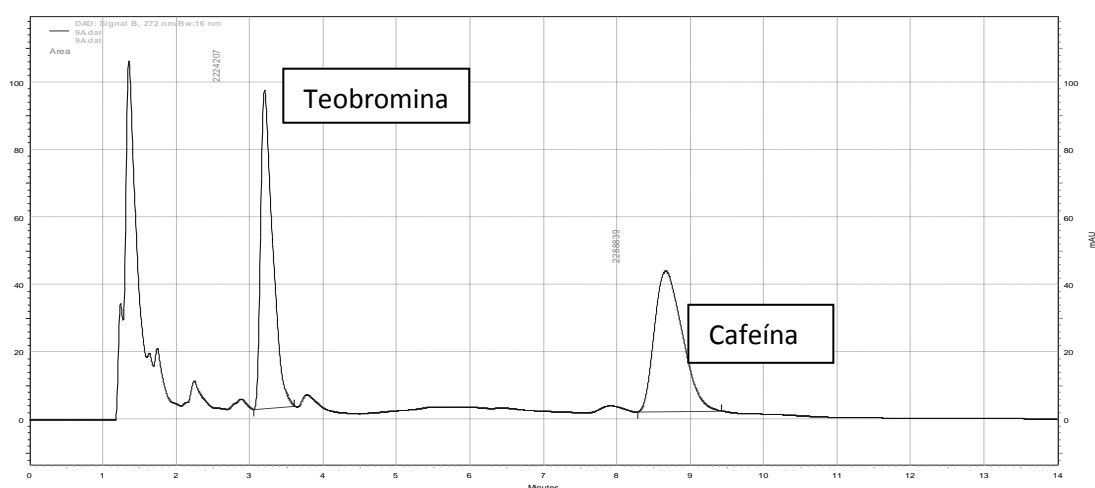


FIGURA 8 – CROMATOGRAMA DE UMA AMOSTRA DE ERVA-MATE

NOTA: CONDIÇÕES DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA: COLUNA ZORBAX ECLIPSE XDB-C18, 4.6 X 150 mm, 5 μ M, UTILIZANDO COMO FASE MÓVEL METANOL: ÁGUA (20:80, v/v) E VAZÃO CONSTANTE DE 1,0 mL min⁻¹; DETECTADOS EM 272 nm.

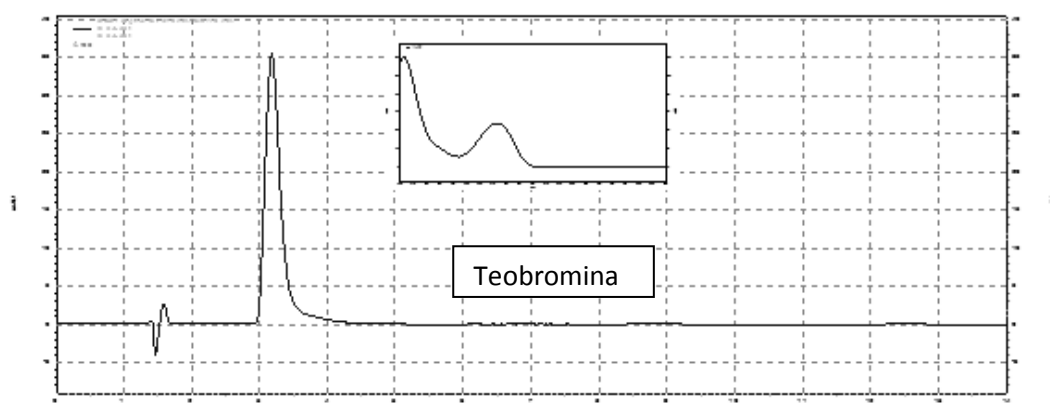


FIGURA 9 – SEPARAÇÃO DO PADRÃO DE TEOBROMINA POR CLAE COM ESPECTROS.

NOTA: CONDIÇÕES DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA: COLUNA ZORBAX ECLIPSE XDB-C18, 4.6 X 150 mm, 5 μ M, UTILIZANDO COMO FASE MÓVEL METANOL: ÁGUA (20:80, v/v) E VAZÃO CONSTANTE DE 1,0 mL min⁻¹; DETECTADOS EM 272 nm.

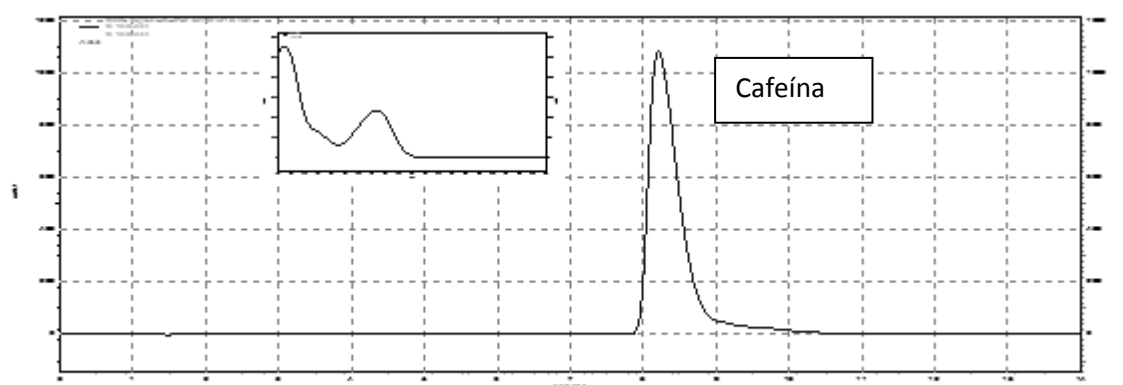


FIGURA 10 – SEPARAÇÃO DO PADRÃO DE CAFEÍNA POR CLAE COM ESPECTROS

NOTA: CONDIÇÕES DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA: COLUNA ZORBAX ECLIPSE XDB-C18, 4.6 X 150 mm, 5 μ M, UTILIZANDO COMO FASE MÓVEL METANOL: ÁGUA (20:80, v/v) E VAZÃO CONSTANTE DE 1,0 mL min⁻¹; DETECTADOS EM 272 nm.

As curvas analíticas apresentaram-se lineares nas faixas de concentrações estudadas (Anexo 1 e 2), com coeficientes de determinação de 0,9946 e 0,9971 (Tabela 6).

TABELA 6 – CARACTERÍSTICAS DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS PADRÕES CAFEÍNA E TEOBROMINA

Compostos	Faixa de concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Coefficiente de determinação (R^2)
Cafeína	0,492 a 384	0,9960
Teobromina	1 a 50	0,9979

Os LD e LQ do método obtidos pelos parâmetros das curvas analíticas para a cafeína e teobromina estão na Tabela 7.

TABELA 7 – LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO OBTIDOS PELO MÉTODO DAS CURVAS ANALÍTICAS

Compostos	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Cafeína	$6,48 \times 10^{-7}$	$1,94 \times 10^{-6}$
Teobromina	$1,27 \times 10^{-4}$	$3,21 \times 10^{-4}$

LD = Limite de Detecção; LQ = Limite de Quantificação

4.2 ESPECTROSCOPIA NIR

Os espectros obtidos das amostras de erva-mate estão representados na Figura 11, sendo possível observar uma boa homogeneidade no conjunto de espectros. Os sinais observados entre 5200 e 4200 cm^{-1} podem ser devido às vibrações de estiramento das ligações C=O, C=C e C=N presentes nas metilxantinas. Os picos em 6900 e 8800 cm^{-1} correspondem ao grupo metila (CH_3) (SINIJA; MISHRA, 2009).

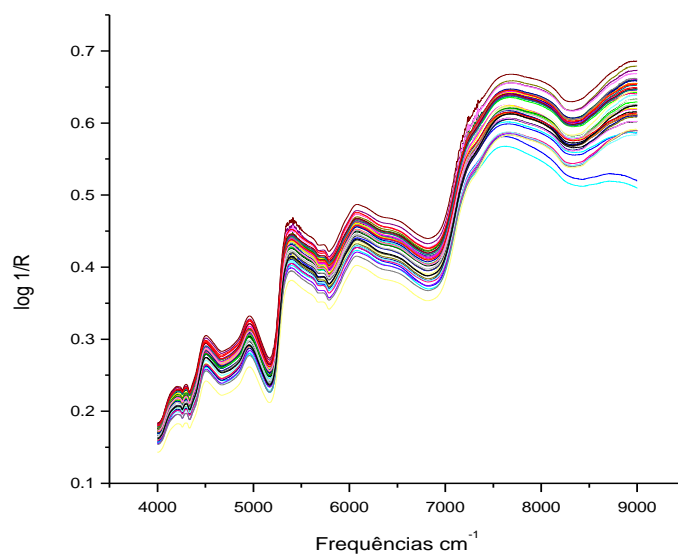


FIGURA 11- ESPECTROS DAS DUPLICATAS DAS 25 AMOSTRAS DE ERVA-MATE. COLETADAS EM UM ESPECTRÔMETRO BRUKER – TENSOR 37, EQUIPADO COM UM ACESSÓRIO DE REFLECTÂNCIA DIFUSA.

Para uma melhor interpretação dos espectros NIR foram utilizadas técnicas multivariadas para análise dos dados dos espectros, tais como PCA e PLS, que possibilitam a análise de todo o espectro para a construção de modelos de calibração.

4.3 DESENVOLVIMENTOS DOS MODELOS MULTIVARIADOS

4.3.1 Análise dos componentes principais

O comprimento de onda de interesse para a quantificação de metilxantinas variou de 4000 a 9000 cm^{-1} , como observado no espectro mostrado na Figura 11, sendo assim os modelos de calibração para quantificação de cafeína, teobromina e metilxantinas totais foram desenvolvidos através da utilização de vários pré-processamentos no intervalo de 4000 a 9000 cm^{-1} .

Inicialmente foi realizado um PCA, de análise qualitativa, para verificar se existiam diferenças entre as amostras, bem como para dividir as amostras que iriam compor os conjuntos de validação, utilizando como pré-processamento MSC, mostrado na Figura 12.

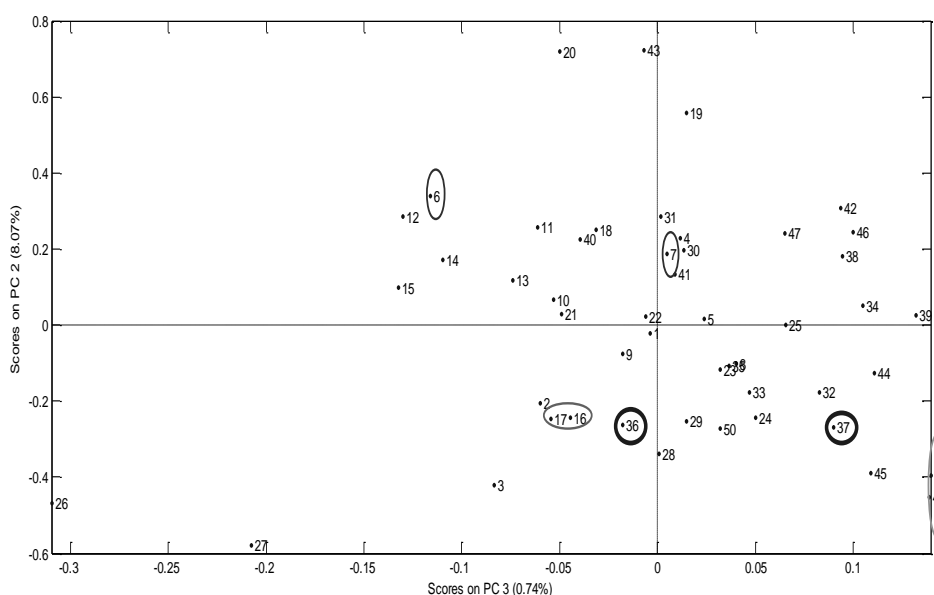


FIGURA 12 – PCA DAS AMOSTRAS DE ERVA-MATE EM UM INTERVALO DE ONDA DE 4000 A 9000 CM^{-1}

Analisando o PCA apresentado na Figura 12 foi possível observar que praticamente todas as informações das amostras são representadas pela primeira componente principal (90,68%), sendo que os detalhes da análise são explicados a partir da segunda componente principal. Além disso, foi verificado que a análise das amostras por NIR apresentou boa repetibilidade já que grande parte das duplicatas ficaram bem próximas, por exemplo, as 16-17 e 48-49, porém algumas estão em quadrantes diferentes, como exemplo tem-se as duplicatas 36-37 e 6-7, este fato pode ter ocorrido devido a falta de homogeneidade da amostra, que apresentava além de folhas trituradas alguns pedaços de palitos. As amostras não apresentaram diferenças entre si, já que não houve separação em diferentes grupos.

Foram separados os conjuntos de calibração e validação a partir do PCA realizado para o desenvolvimento de modelos para cafeína, teobromina e metilxantinas totais, levando em consideração a retirada das amostras de todos os quadrantes e sem retirar amostra dos extremos dos valores de concentração

(FERREIRA *et al*, 1999). O conjunto de validação externa para a cafeína foi composto por 6 amostras e o conjunto de calibração por 42 amostras. Para modelos de calibração para teobromina, o conjunto de calibração e validação também foram constituídos por 42 e 6 amostras, respectivamente. Apesar do total de análises terem sido realizadas para 25 amostras em duplicata, tanto para cafeína quanto para teobromina, uma das amostras resultou em valores de concentração abaixo do LD, sendo removidas do conjunto de calibração.

4.3.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS)

Foram desenvolvidos modelos de calibração multivariada por PLS para prever concentrações de cafeína e teobromina. No conjunto de calibração foram aplicados diferentes pré-tratamentos matemáticos nos dados espectrais com o objetivo de facilitar a interpretação dos espectros melhorando a qualidade de previsão dos modelos de calibração.

Os pré-processamentos aplicados no conjunto de calibração da cafeína foram alisamento seguido de derivação, MSC e SNV.

Na Tabela 8 estão os melhores modelos desenvolvidos para a quantificação de cafeína, analisados através do número de variáveis latentes (VL), bem como os valores de R^2 , RMSECV e erro percentual médio da validação cruzada.

TABELA 8 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA CAFEÍNA

Modelos	Pré-processamento	VL	R²	RMSECV	ERRO (%)
1	Alisamento/1ªderivada	4	0,662	2,21	52,45
2	+ MSC	5	0,704	2,24	45,44
3	Alisamento/2ªderivada	3	0,743	2,29	38,43
4	+ MSC	4	0,836	2,28	42,44
5		5	0,919	2,41	46,30
6	Alisamento/1ªderivada	4	0,662	2,2	52,51
7	+ SNV	5	0,704	2.24	59,04
8	Alisamento/2ªderivada	3	0,765	2,35	41,61
9	+ SNV	4	0,853	2,33	42,39
10		5	0,930	2,44	42,91

A escolha do melhor modelo de calibração deve levar em conta o valor de R^2 e RMSECV, ou seja, o valor do coeficiente de determinação, que deve apresentar um valor mais próximo de 1 possível, e o valor do erro de previsão, que deve ser o mais próximo de zero. Além destes parâmetros o valor do erro de validação externa deve ser levado em consideração.

Em relação aos modelos da Tabela 8, todos apresentam valores de RMSECV muito elevados o que prejudica a capacidade de previsão do modelo. Dentre os pré-processamentos testados o uso de segunda derivada seguida de alisamento e MSC nos dados espectrais apresentaram melhores resultados, ou seja, apresentaram menor erro de previsão.

A escolha do número ideal de variáveis latentes (VL) foi feita através do método de validação cruzada, denominada de “Leave one out”, ou seja, esta escolha modelo foi baseada no gráfico de RMSECV *versus* o número de variáveis latentes como ilustra a Figura 13.

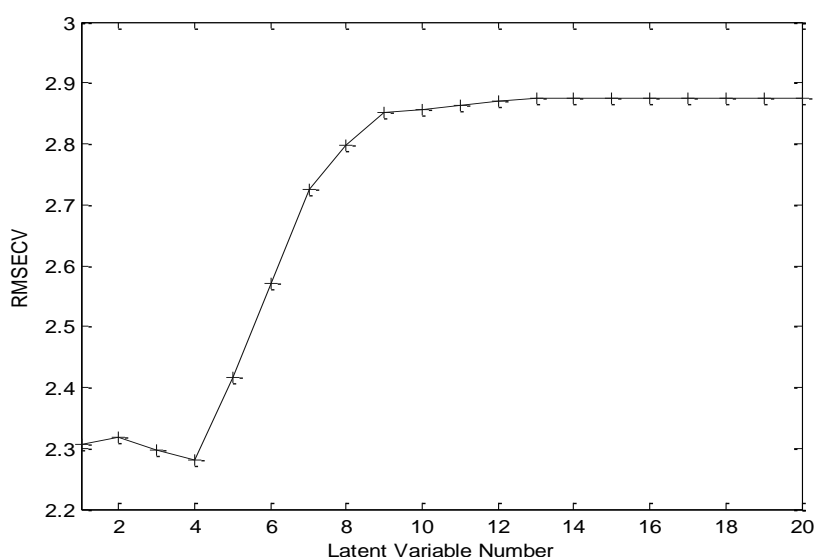


FIGURA 13 - RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VL OBTIDO PELO MÉTODO DE PLS PARA O MODELO DE PREVISÃO DO TEOR DE CAFEÍNA EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE

Pela análise dos valores de RMSECV, conforme a Figura 13 é possível verificar que o menor erro quadrático médio de validação cruzada ocorre com 4VL, apesar disso foram desenvolvidos modelos para 3, 4 e 5 VL, conforme mostrado na Tabela 8. O modelo escolhido como o melhor para a predição dos teores de cafeína em amostras de erva-mate foi o MODELO 4 (Tabela 8).

A otimização do modelo foi realizada através do gráfico de leverage *versus* resíduos de Student do MODELO 4, para verificar a presença de amostras anômalas ou *outliers*, sendo este apresentado na Figura 14.

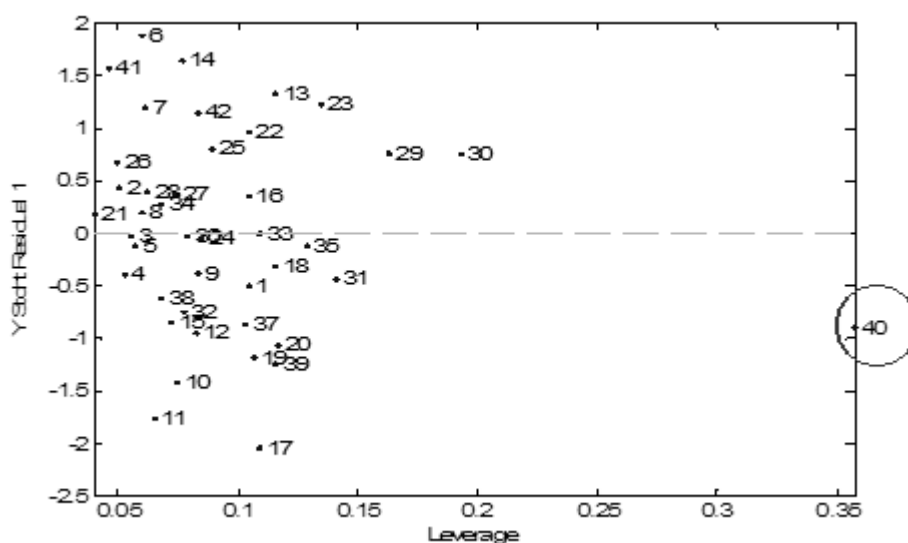


FIGURA 14 – GRÁFICO DE LEVERAGE *VERSUS* RESÍDUOS DE STUDENT PARA MODELO 4.

No gráfico mostrado na Figura 14 a amostra 40 está fora do limite de leverage, neste caso o limite é de 0,285, podendo ser considerada outlier, porém como não houve nenhum problema com esta amostra durante a aquisição do espectro em duplicata, a amostra 40 não foi retirada do conjunto de calibração. Na Figura 15 apresenta o gráfico do valor medido *versus* valor previsto para o MODELO 4.

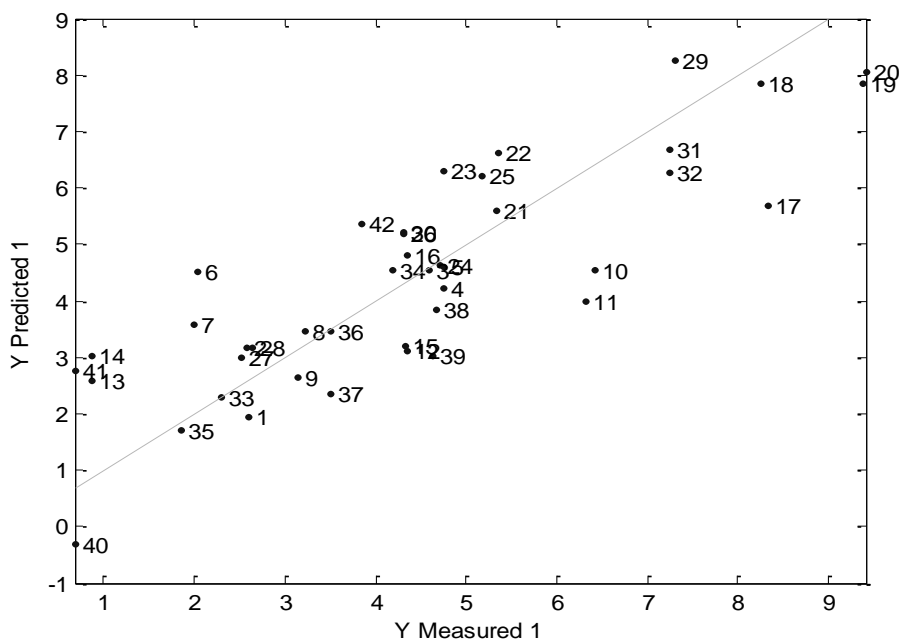


FIGURA 15– GRÁFICO DO VALOR MEDIDO *VERSUS* VALOR PREVISTO PARA MODELO 4, PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO.

Os valores de erro de validação externa para o MODELO 4 apresentaram um valor médio de 42,44%, mostrado na Tabela 8, que se caracteriza por um valor muito elevado, já que o coeficiente de variância para as análises cromatográficas foi de 3,07%, este valor já era esperado devido aos elevados valores de RMSECV encontrados.

Os modelos de calibração desenvolvidos para prever a concentração de teobromina estão apresentados na Tabela 9. Os pré-processamentos utilizados foram os mesmos usados para desenvolvimento dos modelos de calibração para a cafeína.

TABELA 9 - MODELOS DE CALIBRAÇÃO PARA TEOBROMINA

Modelos	Pré-processamento	VL	R ²	RMSECV	ERRO (%)
11	Alisamento/1ªderivada	3	0,563	1,43	28,4
12	+ MSC	4	0,652	1,51	23,2
13	Alisamento/2ªderivada	4	0,903	1,81	46,5
14	+ MSC	5	0,959	1,71	51,5
15		6	0,981	1,71	51,6
16	Alisamento/1ªderivada	4	0,632	1,51	23,2
17	+ SNV	5	0,707	1,53	25,6
18		6	0,739	1,53	26,4
19	Alisamento/2ªderivada	5	0,959	1,73	44,9
20	+ SNV	5	0,963	1,69	45,9
21		7	0,994	1,71	45,7

Dentre os modelos desenvolvidos apresentados na Tabela 9, os desenvolvidos a partir dos pré-processamentos 1ª derivada, alisamento e SNV foram os que tiveram melhor correlação. A partir da Figura 16 é possível observar que o valor do RMSECV começa a diminuir a partir de 13 VL, porém este número de variáveis latentes pode superestimar o modelo de calibração.

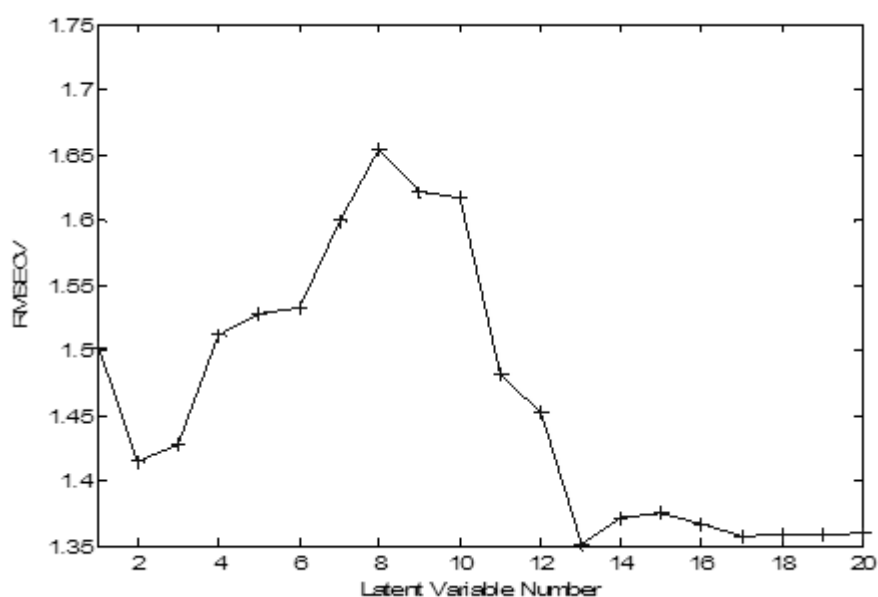


FIGURA 16 - RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VL OBTIDO PELO MÉTODO DE PLS PARA O MODELO DE PREVISÃO DO TEOR DE TEOBROMINA EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE

O gráfico apresentado na Figura 16 não possibilitou a escolha do número ideal de VL, assim foi necessário avaliar a influência que cada variável acrescenta ao modelo. Na Tabela 10 são apresentadas as percentagens da variância explicada por cada variável latente (VL) e a variância total explicada por todas as variáveis latentes para o modelo desenvolvido.

TABELA 10 - VARIÂNCIA DESCRITA PELO MODELO DE PLS PARA A PREVISÃO DO TEOR DE TEOBROMINA EM ERVA-MATE

	Bloco X		Bloco Y	
VL	Esta VL (%)	Total (%)	Esta VL(%)	Total(%)
1	99,34	99,34	78,44	78,44
2	0,39	99,73	4,05	82,49
3	0,08	99,81	2,76	85,25
4	0,03	99,83	2,36	87,61
5	0,04	99,88	1,60	89,20
6	0,05	99,93	0,99	90,19
7	0,01	99,94	2,64	92,83

Com os dados obtidos da Tabela 10 foi possível observar que a partir da quarta variável latente pouca informação espectral é adicionada ao modelo, sendo assim os modelos foram avaliados a partir de 4, 5 e 6 VL. Avaliando os dados da Tabela 9, o modelo que apresenta menor valor de RMSECV e menor porcentagem de erro durante a validação externa é o MODELO 14, para quantificação de teobromina em erva-mate. Na Figura 17 está apresentado o gráfico de leverage *versus* Resíduos de Student. As amostras 20 e 21 aparecem na Figura 17 como amostras anômalas, porém não foi verificado nenhum problema nos espectros destas amostras, sendo então mantidas no conjunto de calibração. No caso do MODELO 14 o limite de leverage foi de 0,285.

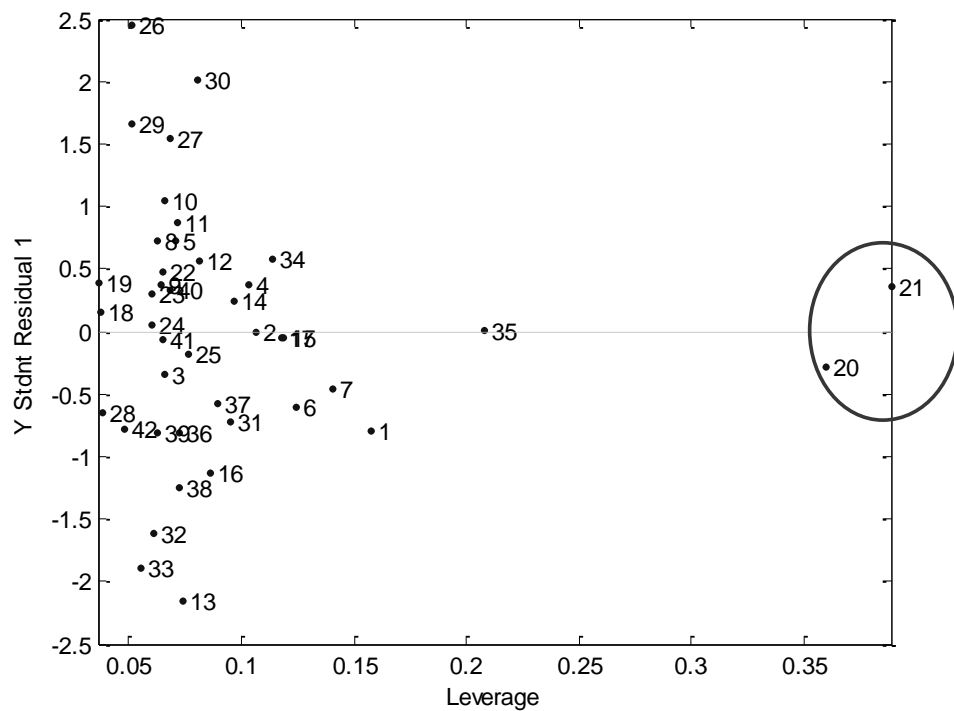


FIGURA 17 – GRÁFICO DE LEVERAGE *VERSUS* RESÍDUOS DE STUDENT PARA MODELO 14.

A Figura 18 apresenta o gráfico do valor real *versus* o valor predito pelo MODELO 14.

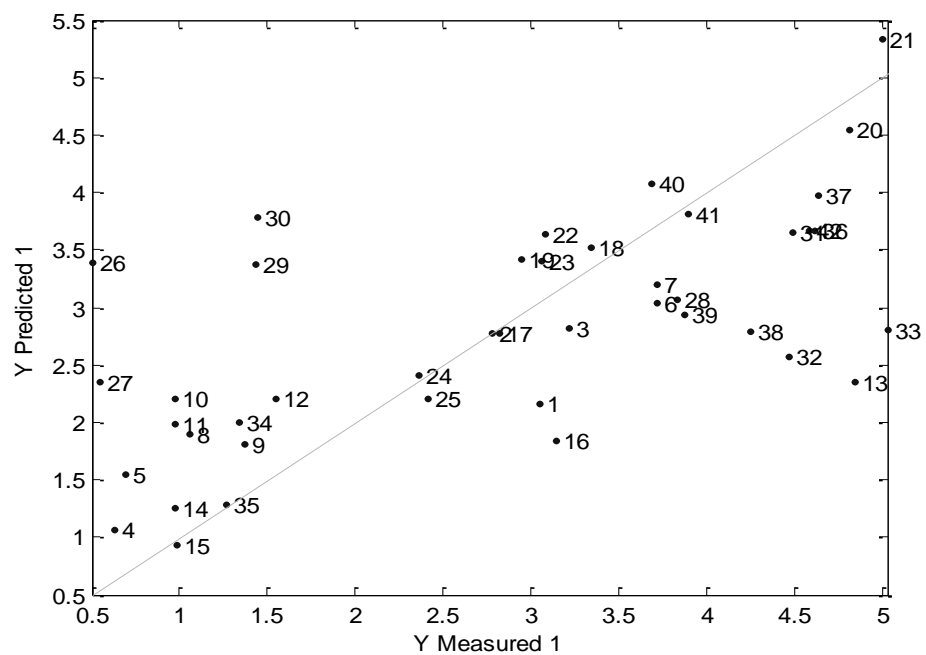


FIGURA 18– GRÁFICO DO VALOR MEDIDO *VERSUS* VALOR PREVISTO PARA MODELO 14, PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO.

O valor do erro médio de validação externa para quantificar teores de teobromina em erva-mate, a partir do MODELO 14 foi de 23,2%, o qual se caracteriza por um valor elevado já que o coeficiente de variância para a análise cromatográfica foi 3,7%.

Os modelos de calibração multivariada para prever cafeína e teobromina em erva-mate não se mostraram adequados, já que apresentaram erros muito elevados de previsão, este fato pode ser devido à baixa sensibilidade do NIR em quantificar compostos que se encontram em baixas concentrações em matrizes alimentares (BURNS; CIURCZAK, 2001).

Um procedimento adotado por vários autores, como Paradkar; Irudayaraj (2002) para amostras de chá e café, Sinija; Mishra (2009) para determinação de cafeína em chá verde, assim como Chen *et al* (2006), foi a quantificação de metilxantinas totais, soma das principais metilxantinas presentes na erva-mate, ou seja, cafeína e teobromina, já que estas apresentam estruturas bem similares. Este mesmo procedimento foi adotado neste trabalho

Os modelos de calibração multivariada para metilxantinas totais apresentados na Tabela 11 foram desenvolvidos a partir de diferentes pré-processamentos, tais como MSC, SNV e alisamento seguido de derivação.

TABELA 11 – MODELOS DE CALIBRAÇÃO MULTIVARIADA PARA METILXANTINAS TOTAIS

Modelos	Pré-processamento	VL	R²	RMSECV	ERRO (%)
22	Alisamento/1ªderivada	4	0,79	0,19	12,27
23	+ MSC	5	0,83	0,18	10,16
24		6	0,84	0,18	10,80
25	Alisamento/1ªderivada	4	0,79	0,19	13,25
26	+ SNV	5	0,83	0,18	10,25
27		6	0,84	0,18	10,87
28	Alisamento/2ªderivada	4	0,92	0,20	7,50
29	+ MSC	5	0,97	0,21	11,50
30	Alisamento/2ªderivada	3	0,78	0,19	8,25
31	+ SNV	4	0,92	0,19	9,25

Pela Tabela 11 é possível observar que o valor de RMSECV diminuiu se comparados com os valores dos modelos apresentados nas tabelas 8 e 9. Este fato pode ser explicado pela falta de capacidade do NIR de analisar substâncias de estruturas muito similares, como no caso cafeína e teobromina, ou seja, o NIR analisa ambas as substâncias como um único composto. Os pré-processamentos que apresentaram melhores modelos foram 1ª derivada, alisamento e MSC, onde o MODELO 28 foi escolhido como o melhor modelo de calibração.

Para escolha do melhor modelo de calibração multivariada foi levado em consideração o número de VL, o valor de R^2 , RMSECV e do erro médio de validação externa. O número de VL é um importante fator para a otimização do modelo, sendo que a seleção de um número pequeno de VL pode excluir do modelo informações analíticas relevantes, enquanto que um número elevado de VL pode superestimar o modelo e levar ao comprometimento da previsão em amostras que não participaram do conjunto de calibração (ANDRADE, 2009). A escolha do número ideal de variáveis latentes para o MODELO 28 foi feita através do gráfico apresentado na Figura 19.

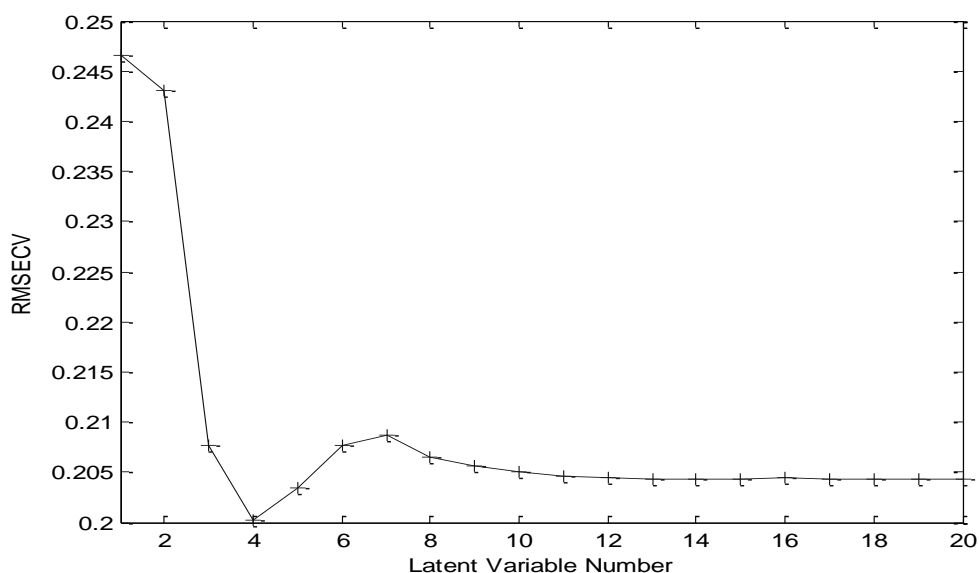


FIGURA 19 - RMSECV *VERSUS* NÚMERO DE VL OBTIDO PELO MÉTODO DE PLS PARA O MODELO DE PREVISÃO DO TEOR DE METILXANTINAS TOTAIS EM AMOSTRAS DE ERVA-MATE

O número de variáveis latentes que apresenta o menor valor de RMSECV neste caso são 4. O modelo desenvolvido com 4 VL apresentou um valor de

RMSECV de 0,2 e um R^2 de 0,924. Através da análise Figura 20 foi verificado a ausência de amostras anômalas, onde o limite de leverage foi de 0,29.

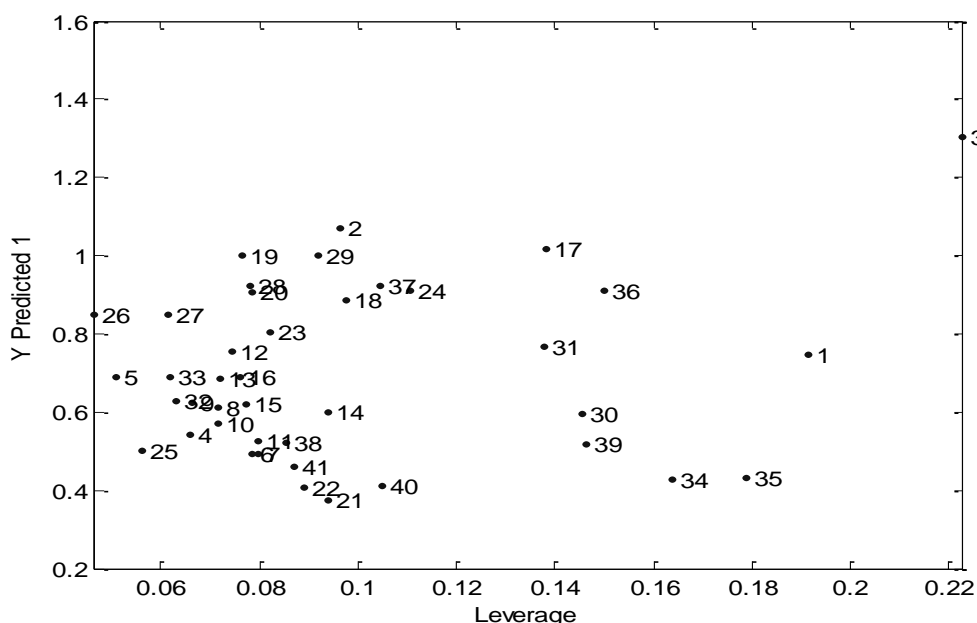


FIGURA 20 – GRÁFICO DE LEVERAGE *VERSUS* RESÍDUOS DE STUDENT PARA MODELO 28.

A capacidade de previsão do MODELO 28 também foi avaliada através da validação externa, utilizando as 9 amostras separadas para esta finalidade. Os resultados, apresentados na Tabela 12, indicam que erro médio da validação externa foi de 7,5% caracterizando assim o modelo adequado para quantificação de metilxantinas em amostras de erva-mate. O valor do coeficiente de variância para a análise de metilxantinas totais foi de 3,7%.

TABELA 12 – VALIDAÇÃO EXTERNA PARA O MODELO 28.

Amostra	Valor real (mg g ⁻¹)	Valor previsto (mg g ⁻¹) pelo modelo 28	Erro (%) modelo 28
1	8,45	7,28	13,85
2	4,96	4,77	3,83
3	7,84	6,44	17,8
4	7,41	8,37	12,9
5	7,09	6,98	1,55
6	5,91	6,35	7,44
7	4,88	4,59	5,94
8	7,784	7,78	0,05
9	8,13	7,77	4,43
Erro médio			7,5

A Figura 21 apresenta o valor predito pelo modelo de calibração versus o valor medido pela análise cromatográfica para o MODELO 28.

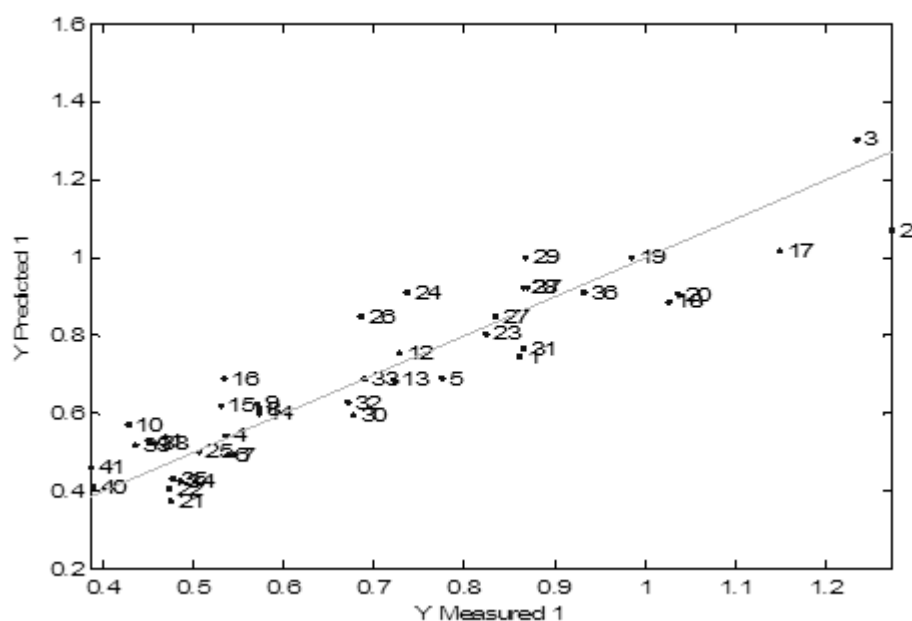


FIGURA 21– GRÁFICO DO VALOR MEDIDO *VERSUS* VALOR PREVISTO PARA MODELO 28, PARA O CONJUNTO DE CALIBRAÇÃO

Sinija; Mishra (2009) desenvolveram modelos de calibração para quantificação de metilxantinas totais em chá verde, utilizando como pré-processamento 1ª derivada e “straight line subtraction”, um modelo com 6 VL e R^2 de 0.99 com erro de previsão de 1,86%. Porém utilizando 4 VL obtiveram um modelo de calibração com R^2 de 0,84 e um erro de previsão de 10,7%, sendo que neste caso o pré-processamento utilizado foi 1ª derivada e normalização. Dessa forma o erro médio de validação externa, de 7,5% para o MODELO 28 desenvolvido nesse trabalho, está dentro dos valores encontrados por outros pesquisadores.

Os valores dos coeficientes de correlação (R^2) para as etapas de calibração, validação cruzada e validação externa foram de 0,938, 0,541 e 0,66, respectivamente. Estes valores encontram-se adequados já que os valores de R^2 das etapas de validação cruzada e externa devem ser menores do que o valor de R^2 da calibração.

Sendo assim, o modelo de calibração multivariada desenvolvido e validado com base no conjunto de dados obtidos da espectroscopia de infravermelho próximo para a análise do teor de metilxantinas totais em erva-mate, é uma opção eficaz

para substituição das análises tradicionais por CLAE. A análise por NIR é rápida, sem geração de resíduo laboratorial, não destrutiva da amostra, podendo ser aplicada *online* para controle de metilxantinas em qualquer etapa do processamento da erva-mate.

CONCLUSÕES

Os teores de cafeína e teobromina quantificados por CLAE após digestão ácida das amostras variaram de 0,68 a 10,11 mg g⁻¹ para a cafeína e para teobromina de 0,5 e 5,03 mg g⁻¹, estando coerentes com os teores determinados por diversos autores. Em relação às metilxantinas totais, foram definidos teores entre 3,69 a 12,76 mg g⁻¹.

Os espectros obtidos na região infravermelho próximo, com transformada de Fourier por reflectância difusa apresentaram homogeneidade. As regiões espectrais na faixa de 4000 a 9000 cm⁻¹ foram analisadas através de modelos de calibração multivariada usando análise por PCA e a regressão por PLS, não apresentando diferença entre as amostras a partir da análise por PCA.

Os modelos de calibração desenvolvidos por PLS para quantificar separadamente cafeína e teobromina não apresentaram boa correlação, comprovada pelos altos valores obtidos de erros de calibração e validação externa, ou seja os valores de RMSECV e R² foram de 2,28 e 0,836, respectivamente, para a cafeína. Para a teobromina o RMSECV foi de 1,71 e o R² de 0,959.

A quantificação de metilxantinas totais, soma da cafeína e teobromina, por NIR, utilizando modelo de calibração por PLS, com os pré-processamentos de alisamento seguido de derivação e MSC, apresentou boa capacidade preditiva com erro de validação externa de 7,5%.

A espectroscopia na região do infravermelho próximo associada às técnicas de calibração multivariada mostrou-se um método apropriado para determinar o teor de metilxantinas totais em erva-mate, podendo ser aplicado como método de análise rápida e não destrutiva no controle de qualidade durante a produção.

REFERÊNCIAS

ALIKARIDIS, F. Natural constituents of Ilex species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 121-144, 1987.

ALMEIDA, F. M. N. **Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril**. 84f.. Dissertação (Mestrado), Departamento de Engenharia Química e Biológica, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

ALMEIDA-RUCKER, N., *et al.* **Desempenho dos indicadores do produto e serviços mate período compreendido entre 1993 e 2010**. Curitiba: SEAB, p.16, 2011

ANUÁRIO BRASILEIRO DA ERVA-MATE, 1999, Santa Cruz do Sul (RS): Erva mate. **Gazeta Grupo de Comunicações**, 1999.

ASHIHARA, H.; SUZUKI, T. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1864-1876, 2004.

ATHAYDE, M. L.; COELHO, G. C.; SCHENKEL, E. P. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of Ilex paraguariensis A. St.-Hil. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 853-857, 2000.

AZZOUZ, T. ET AL. Comparison between different data pré-treatment methods in the analysis of forage samples using near-infrared diffuse reflectance spectroscopy and partial least-squares multivariate calibration method. **Analytica Chimica Acta**, v. 484, p. 121-134, 2003.

BERTÉ, K. A. S. **Tecnologia da Erva-Mate**. Tese (Doutorado), 160f. Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, Paraná, 2011.

BJORSVIK, H., Reaction Monitoring in Explorative Organic Synthesis Using Fiber-Optical NIR Spectroscopy and Principal Component Analysis, **Applied Spectroscopy**, v. 50, p. 1541 – 1544, 1996.

BORTOLUZZI, A. *et al.* M. Quantificação de metilxantinas e compostos fenólicos em amostras comerciais de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). In: CONGRESO SUDAMERICANO DE LA YERBA MATE, 4., 2006, Posadas. **Anais...** Posadas:UNaM, EPAGRI, p. 143 – 147, 2006.

BRÁS, L. P. ET AL. Multiblock PLS as na approach to compare and combine NIR and MIR spectral in calibrations of soybean flour. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 75, n. 1, p. 91-99, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 302. **Diário Oficial da União**, 08 de novembro de 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 277, de 25 de setembro de 2005. Regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 23 set. 2005.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia S. A, 1991.

BRUNETON, J. **Pharmacognosie et phytochimie de plants medicinales**. 2. Ed.Paris:Lavosier, 1993.

BURNS, D. A. CIURCZAK, E. W. **Handbook of Near-Infrared Analysis**. Marcel Dekker, New York, 2001.

CARDOSO JÚNIOR, E. L. *et al.* Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 553-558, 2007.

CHEN, Q. *et al.* Feasibility study on qualitative and quantitative analysis in tea by near infrared spectroscopy with multivariate calibration. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, p. 77-84, 2006.

CLIFFORD, M.N., RAMIREZ-MARTINEZ, J.R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of mate (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v.35, 13–21, 1990.

COATES, J. A review of current new technology: Used in instrumentation for industrial vibrational spectroscopy, **Spectroscopy**, 10, 21-34, 1999.

COELHO, G.C.; ATHAYDE, M.L.; SCHENKEL, E.P., 2001. Methylxanthines of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. var. *vestita* Loes. and var. *paraguariensis*. **Braz. J. Pharm. Sci.** 37, 153-158, 2001.

COELHO, G.C.; MARIATH, J.E.A.; SCHENKEL, E.P. Populational diversity on leaf morphology of mate´ (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. Aquifoliaceae). **Brazilian Archives of Biology and Technology** , v. 45,p. 47–51., 2002.

COELHO, G. C. et al. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 2, p. 75-80, 2007.

CORDEIRO, G. A. **Desenvolvimento de metodologias espectroscopia multivariadas para quantificação de fármacos em formas farmacêuticas**, 97f. Dissertação (Mestrado em química analítica). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, 2006.

COSTA FILHO, P. A. **Estudo comparativo de técnicas de inteligência artificial e modelos lineares em determinações quantitativas no infravermelho próximo**, 201f. Tese (doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, São Paulo, 2003.

COZZOLINO, D., RESTAINO, E., FASSIO, A. Discrimination of yerba mate (*Ilex paraguayensis* St. Hil.) samples according to their geographical origin by means of near infrared spectroscopy and multivariate analysis. **Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety**, 4, 67–72, 2010.

DA CROCE, D. M. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) no estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal**, v. 12, n. 2, p.107-113, 2002.

DAVIES, A.M.C. William Herschel and the discovery of near infrared. **Spectrosc. Eur.** 12, 10–16, 2000.

DUTRA, F. L. G.; HOFFMANN-RIBANI, R. Influência da extração na determinação de metilxantinas por CLAE em erva-mate estacionada natural e acelerada. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7, 2007, Campinas. **Anais...** CD-ROM, 2007.

DUTRA, F. L. G. **Compostos Fenólicos e Metilxantinas em Erva-Mate Armazenada em Sistemas de Estacionamento Natural e Acelerado**, 76f. Dissertação (mestrado), Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, Paraná, 2009

ESMELINDRO, M. C., *et al.* Caracterização físico-química da erva-mate: Influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 193-204, 2002.

FERRÃO, M. F. **Aplicação de técnicas espectroscópicas de reflexão no infravermelho no controle de qualidade da farinha de trigo**, 219f. Tese (doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, São Paulo, 2000.

FERRAO, M.F.; Técnicas de reflexão no infravermelho aplicadas na análise de alimentos. **Tecnológica**, v. 5, p. 63, 2001.

FERREIRA, M. M. C. *et al.* Quimiometria I: Calibração Multivariada, um Tutorial, **Química Nova**, v.22, n. 5, 1999.

FIDÊNCIO, P. H. **Análise de solos por espectroscopia no infravermelho próximo e aplicação de métodos quimométricos**. Tese (doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, São Paulo, 2001.

FILIP, R. *et al.* Mate substitutes or adulterants: study of xanthine content. **Phytotherapy Research**, v. 12, p.129-131, 1998.

FILIP, R.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G. Phytochemical study of *Ilex dumosa*. **Acta Hort.**, n. 502, p. 405-408, 1999

FILIP, R.*et al.* Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 1, p. 1437-1446, 2000.

GELADI, P.; KOWALSKI, B. R.; Partial Least-Squares Regression: A Tutorial, **Anal. Chem. Acta**, v. 185, p. 1-17, 1986.

GNOATTO, S. C.B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponin in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 16, n. 4, 723-726, 2005.

GNOATTO, S. C. B., *et al.* Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 304-307, 2007.

GONZALES, A. *et al.* Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v. 39, p. 217-237, 1993.

GORZALCZANY, S. *et al.* Choleric effect and instestinal propulsión of “mate” (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterantes. **J. Ethnopharmacol**, v. 75, p. 291-294, 2001.

GUGLIUCCI, A.; MENINI T. The botanical extracts of *Achyrocline satureoides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III.. **Life Sciences**, v.72, p.279-292, 2003.

HALL, J.W. *et al.* Near-Infrared Spectroscopic Determination of Acetate, Ammonium, Biomass, and Glycerol in an Industrial *Escherichia coli* Fermentation, **Applied Spectroscopy**, v. 50, p. 102-108, 1996.

HERRERA, J., GUESALAGA, A.; AGOSIN, E. Shortwave-near infrared spectroscopy for nondestructive determination of maturity of wine grapes. **Measurement Science and Tecnology**, v. 14, p. 689-697, 2003.

HOSKULDSSON, A.; PLS Regression Methods, **J. Chemometrics**, v. 2, 1988.

JACQUES, R.A. *et al.* The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.14, n.1, p.6-12, 2007.

MARTENS, H.; NAES, T. **Multivariate calibration**. New York: Wiley, 1996.

MATLAB – The Language of Technical Computing, version 6.5; The MathWork Inc. 2001.

MAZZAFERA, P., YAMAOKA-YANO, D. M., VITÓRIA, A. P. Para que serve a cafeína em plantas?. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, n.1, p. 67-74, 1996.

MESSERSCHIMIDT, I. **Análise quantitativa por espectroscopia no infravermelho médio empregando técnicas de reflectância e calibração multivariada**, 138f. Tese (doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, São Paulo, 1999.

MORGANO, M. A. *et al.* Determinação de proteína em Café Cru por Espectroscopia NIR e Regressão PLS. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 25, p. 25-31, jan-mar, 2005.

MORGANO, M. A. *et al.* Determinação de açúcar total em café cru por espectroscopia no infravermelho próximo e regressão por mínimos quadrados parciais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 346-350, 2007.

NAGATA, N. BUENO, M. I. M. S. PERALTA-ZAMORA, P. Métodos matemáticos para a correção de interferências espectrais e efeitos interelementos na análise quantitativa por fluorescência de raios – X. **Química Nova**, São Paulo – SP, v. 24, p. 531-539, Jul/Ago. 2001.

NAGATA, N.; **Uso de métodos de calibração multivariada na análise de amostras de interesse industrial e espécies de importância ambiental por fluorescência e de raios-X.** 138f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2001.

NAKAMURA, K. L. **Variabilidade genética e métodos de extração de metilxantinas e compostos fenólicos em Erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.),** 79f. Dissertação (mestrado), Universidade Paranaense – UNIPAR. Umuarama, Paraná, 2008.

NICOLAI, B. M. Nondestructive measurement of fruit and vegetable quality by means of NIR spectroscopy: A review. **Postharvest Biology and Technology**, v. 46, p. 99–118, 2007.

NIETSCHE, K. **Caracterização da qualidade da erva-mate cancheada,** 89f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, Paraná, 2002.

OLIVEIRA, F. C. C. A. A escolha da faixa espectral no uso combinado de métodos espectroscópicos e quimiométricos. **Química Nova**, v. 27, n. 2, p. 218-225, 2004

ORTIZ, M. C. *et al.* Sensitivity and specificity of PLS-class modelling for five sensory characteristics of dry-cured ham using visible and near infrared spectroscopy. **Analytica chimica Acta**, v. 558, p. 125-131, 2006.

OSBORNE, B. G. Near-infrared spectroscopy in food analysis. **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, In _ Robert A. Meyers. Ó John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 1-14, 2000.

OTTO, M. **Chemometrics: statistics and Computer Application in Analytical Chemistry**. Wiley – VCH, New York, 1999.

OZAKI, Y.; MCCLURE, W.F.; CHRISTY, A. A. **Near-infrared spectroscopy in food science and technology**. Wiley Inter-science, p. 408, 2007.

PANERO, J. S. **Determinação de proteína, óleo e umidade por espectroscopia NIR em grãos de soja do estado de Roraima**, 106f. Universidade Federal de Roraima - UFRR. Boa Vista, Roraima, 2008.

PARADKAR, M. J.; IRUDAYARAJ, J. A rapid FTNIR spectroscopy method for estimation of caffeine in soft drinks and total methylxanthines in tea and coffee. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 7, p. 2507-2511, 2002.

PARANÁ. Câmara Setorial da Cadeia Produtiva da Erva-Mate. **Produtos alternativos e desenvolvimento da tecnologia industrial na cadeia produtiva da erva-mate**. Curitiba: Ed. do autor. Série PADCT III, n. 1, p.160, 2000.

PASTI, L. et al. Application of Fourier transform to multivariate calibration of near-infrared data. **Analytica Chimica Acta**, Brussel, v. 364, p. 253-263, may, 1998.

PASQUINI, C.; Near Infrared Spectroscopy: Fundamentals, Pratical Aspects and Analytical Applications, **J. Brazil Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 198-219 2003.

PIZARRO, C. *et al.* Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Quimica Nova**, v. 19, n. 3, 2004.

RATES, S. M. K. SIMÕES, C. M. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

REGINATTO, F. H. *et al.* Methylxanthines accumulation in *Ilex* Species - Caffeine and theobromine in erva mate (*Ilex paraguariensis*) and other *Ilex* Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 10, n. 6, p. 443-446, 1999.

REYNOLDS, J. E. F. (ed). Martindale – the extra pharmacopeia. 30 ed. London: Pharmaceutical, 1993.

RIBEIRO, D. B. M. **Desenvolvimento de metodologias analíticas multivariadas empregando espectroscopia Raman de baixa resolução amplificada por superfície**. 131f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2009.

RINNAN, A., BERG, F. V. D. ENGELSEN, S. B. Review of the most common preprocessing techniques for near-infrared spectra. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.

ROGGO, Y. ET AL. A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical Technologies. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 683-700, 2007.

ROTTA, E. OLIVEIRA, Y.M.M. **Cultivo da erva-mate**. Colombo: Embrapa florestas, (Sistemas de produção n.1), 2005.

SALDANÃ, M. D. A. *et al.* Extraction of purine alkaloids from maté (*Ilex paraguariensis*) using supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3804-3808, 1999.

SAUER, E. **Desenvolvimento de metodologias multivariadas Para análise de queijos por espectroscopia drift**. 157f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SEAB. SECRETÁRIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Erva-mate: prospecção tecnológica da cadeia produtiva**. Curitiba: SEAB, p. 125, 1997.

SCHMALKO, M. E. ALZAMORA, S. M. Color, chlorophyll, caffeine, and water content variation during yerba maté processing. **Drying Technology**, v. 19, p. 597-608, 2001.

SCHINELLA, G. R. *et al.* Antioxidant effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Biochemical and biophysical research communications**, , v. 269, n. 2, p. 357-360, 2000.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, v. 24, p. 360 -366. 2005.

SCHUBERT, A. *et al.* Variação anual de metilxantinas totais em amostra de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Erva-mate) em Ijuí e Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1233-1236, 2006.

SIESLER, H.W., Near -Infrared Spectroscopy of Polymers, Makromol. Chem., Macromol. **Symp.**, v. 52, p. 113 – 129, 1991.

SHINIJA, V. R. MISHRA, H. N. FT- NIR spectroscopy for caffeine estimation in instant green tea powder and granules. **Food Science and Technology**, v. 42, p. 998-1002, 2009.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 2ª ed. Ver. – Porto Alegre / Florianópolis: Editora Universidade / UFRGS / Editora da UFSC, p. 723-738, 2001.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SKOOG, D. A; HOLLER, F. J. NIEMAN, T. **Princípios de análises Instrumental**. 5ª Ed., São Paulo, 2002.

SOUZA, E. R. **Determinação de parâmetros de qualidade de gasolina e estudo de contaminantes utilizando espectros do infravermelho próximo na fase vapor**. 142f. Tese (doutorado). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, São Paulo, 2005.

STEFANOVICH, V. The xantines. **Drug news Perspec.**, v.2, n.2, p. 82-88, 1989.

STRATIS, D.N. *et al.* Comparison of acousto-optic and liquid crystal tunable filters for laser-induced breakdown spectroscopy. **Appl. Spectrosc.**, v. 55, p. 999–1004, 2001.

SUZUKI, T. ASHIARA, H. WALLER, R. Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants. **Phytochemistry**, v.31, n.8, p.2575-2584, 1992.

THE MERCK INDEX. 22 ed. New Jersey:Merck, 1996.

VALDERRAMA, P. **Avaliação de figuras de mérito em calibração multivariada na determinação de parâmetros de controle de qualidade em indústria alcooleira por espectroscopia no infravermelho próximo**, 135f. Dissertação (mestrado)

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2005.

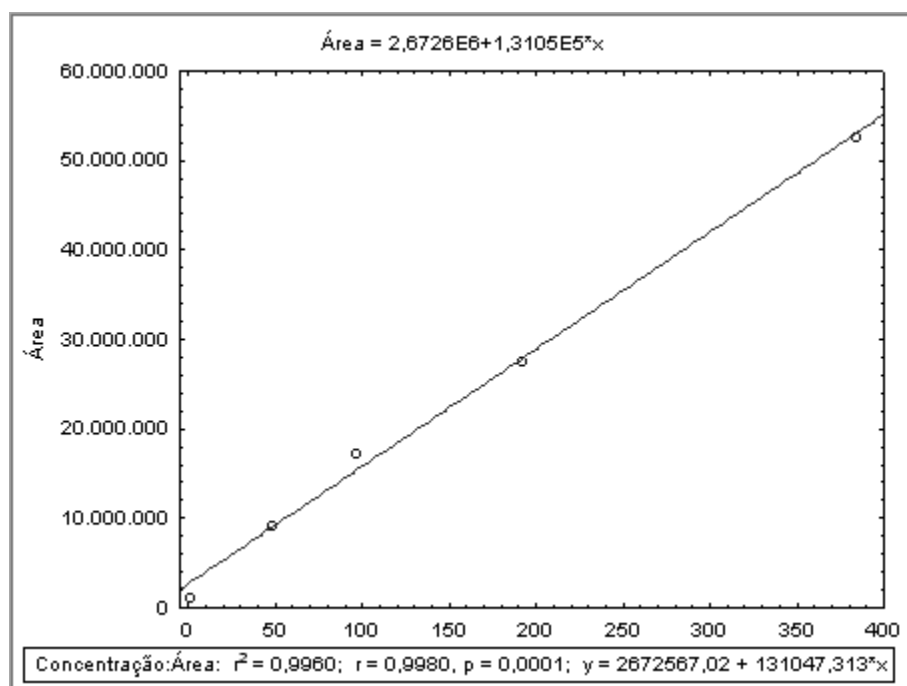
VALDUGA, E. **Caracterização química e anatômica da folha de *Ilex paraguariensis* St. Hill e de algumas espécies utilizadas na adulteração do mate.** 97f. Dissertação (Mestrado) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.

VALDUGA, A.T.; FINZER, J.R.D.; MOSELE, S.H. **Processamento de erva-mate.** Erechim: Edifapes, p. 184, 2003.

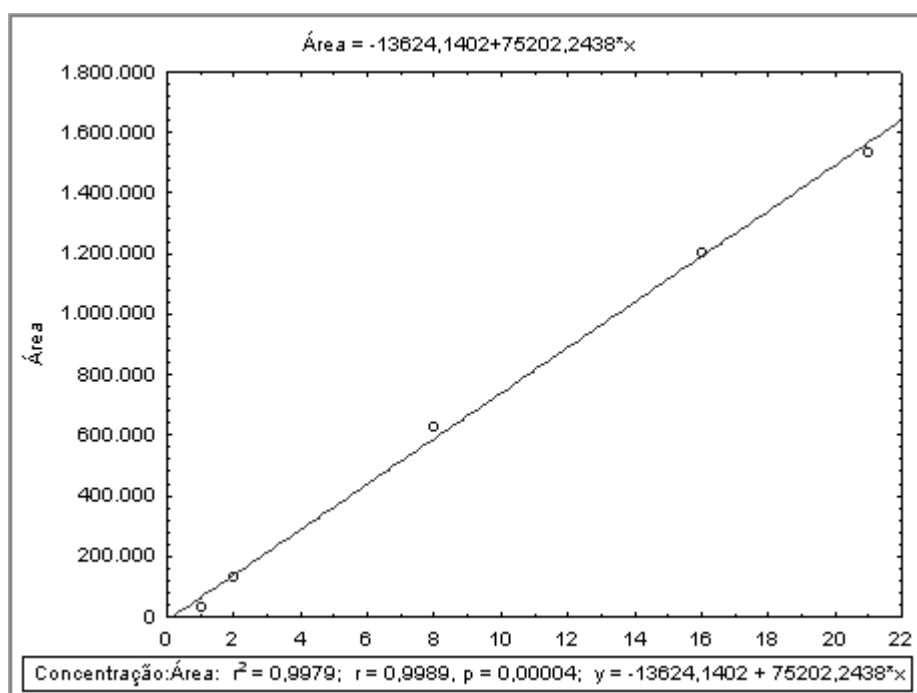
WILLIAMS, P.; NORRIS, K. **Near-Infrared technology in the agriculturam and food industries.** Minnesota: AACCC, 1998.

WORKMAN, J. J. JR., KOWALSKI, B. R, BRO, R. Review of chemometrics applies to spectroscopy. **Appl. Spectrosc. Rev.**, v .31, p. 1985-1995, 1996.

ANEXO 1

FIGURA 1 - CURVA ANALÍTICA DO PADRÃO CAFEÍNA NA FAIXA DE 0,492 a 384 $\mu\text{g mL}^{-1}$

ANEXO 2

FIGURA 1 - CURVA ANALÍTICA DO PADRÃO TEOBROMINA NA FAIXA DE 1 a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$